

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна  
Міністерство освіти і науки України  
Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна  
наукова праця  
на правах рукопису

**ЗАІД АЛІ АЗІЗ**

УДК 631.461:631.531.027.04(043.5)

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«ВПЛИВ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ НА МІКРОБІОТУ**  
**РИЗОСФЕРИ ТА ЕКСКРЕТОРНУ АКТИВНІСТЬ ПРОРОСТКІВ»**

Спеціальність 03.00.20 – «Біотехнологія»  
(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело \_\_\_\_\_ ЗАІД АЛІ АЗІЗ

Науковий керівник: Божков Анатолій Іванович, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

*ЗАІД АЛІ АЗІЗ* **Вплив передпосівної обробки насіння на мікробіоту ризосфери та екскреторну активність проростків** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальність 03.00.20 – біотехнологія (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України; Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» Міністерства освіти і науки України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню впливу різних способів передпосівної обробки насіння і гороху на інтенсивність росту проростків у водній культурі, на якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів з 1 по 3 добу росту проростків з метою їх отримання і оцінки їх біологічної активності. Як відомо, корінь в процесі життєдіяльності виділяє в середовище від 40 % до 60 % органічних речовин. До складу корневих екзометаболітів (КЕМ) входять білки, вуглеводи, ліпіди, вільні амінокислоти, вітаміни та ін. біологічно активні сполуки. Раніше було показано, що кореневі екзометаболіти беруть участь у регуляції біологічних процесів. Незважаючи на перспективи використання проростків як продуцентів біологічно активних сполук такі технології відсутні. Це пояснюється кількома причинами. При культивуванні проростків у водній культурі може відбуватися контамінація корневих екзометаболітів. На поверхні насіння також завжди присутні різні мікроорганізми і є проблема видалення епіфітної мікрофлори насіння. Більш того, серед епіфітних мікроорганізмів можуть бути мікроорганізми, які виявляють токсичні властивості. У зв'язку з цим, окремим завданням у розвитку корневих біотехнологій є розробка способів передпосівної обробки насіння, які здатні видаляти епіфітну мікрофлору. Разом з тим, необхідно враховувати, що видалення епіфітних мікроорганізмів

може впливати на якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів. У зв'язку з цим, для розвитку корневих біотехнологій необхідне комплексне рішення цілого ряду взаємопов'язаних питань. Поряд з цим, важливим аспектом при отриманні корневих екзометаболітів є підбір рослинних об'єктів, бо вони можуть продукувати в середовище різні метаболіти, які мають різну біологічну активність.

У роботі було обрано два об'єкти - пшениці і горох. Такий вибір дозволить встановити взаємозв'язок між типом кореневої меристеми («відкритий», «закритий») і екскреторною активністю кореня.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідити вплив передпосівної обробки насіння на епіфітну мікробіоту, якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху і їх біологічну активність.

У роботі використовували різні способи передпосівної обробки насіння пшениці:

1-й спосіб - зерна замочували в 0,05 % розчині перманганату натрію на 5 хвилин, а потім промивали стерильною дистильованою водою.

2-й і 3-й способи -зерна замочували в 70 % етиловому спирті, промивали стерильною дистильованою водою, а потім замочували в 5 % гіпохлорит натрію. 2-й і 3-й способи розрізнялися часом замочування зерен у даних розчинах.

Водні кореневі екзометаболіти пшениці та гороху збирали в проточному режимі з 1 по 3 добу культивування.

Інтенсивність росту проростків пшениці і гороху з 1 по 3 добу була нелінійної, з максимальною питомою швидкістю росту на 2 добу росту. Передпосівна обробка насіння пшениці 2-м та 3-м способами приводила до стимуляції росту проростків коренів, у разі гороху - тільки 3 спосіб передпосівної обробки стимулював ріст коренів.

При вивченні кількісного і якісного складу водних корневих екзометаболітів проростків пшениці і гороху було виявлено, що вміст білка, вільних амінокислот і вуглеводів в екзометаболітах пшениці збільшувався з 1

по 3 добу, а в КЕМ гороху він не змінювався або змінювався незначно. Передпосівна обробка насіння гороху не впливала на динаміку вміста даних компонентів у складі водних корневих екзометаболітів гороху. Тоді як передпосівна обробка насіння пшениці 3-м способом приводила до зниження вмісту вуглеводів і амінокислот і збільшення вмісту білків у складі КЕМ пшениці.

Було виявлено, що загальний вміст корневих екзометаболітів гороху на 1 добу росту проростків був у 4 рази більше в порівнянні з вмістом корневих екзометаболітів пшениці. Передпосівна обробка насіння пшениці 3-м способом приводила до зниження загальних корневих екзометаболітів, а обробка насіння гороху - до збільшення, але тільки на 3 добу росту.

Водні кореневі екзометаболіти пшениці були представлені на 67 % вуглеводами, а водні кореневі екзометаболіти гороху – 85 % білками. Тільки 3-й спосіб передпосівної обробки насіння пшениці впливав на співвідношення білків, вуглеводів і вільних амінокислот у складі КЕМ пшениці, на відміну від КЕМ гороху.

Відомо, що прикордонні клітини кореня грають важливу роль у характеристиці екскреторної активності коренів, зокрема вносять істотний внесок в їх екскреторну активність. Прикордонні клітини коренів пшениці та гороху розрізнялися за розмірами і формою. У 1 добових коренів пшениці виявляється близько 100 клітин на корінь, в той час як у гороху їх кількість становила близько 1500 і більше клітин на корінь. Це може пояснювати відмінності в складі корневих екзометаболітів пшениці і гороху. Ці результати вказують на взаємозв'язок між організацією типу кореневої меристеми і кількістю прикордонних клітин кореня.

Таким чином, однотипна передпосівна обробка насіння пшениці і гороху по-різному впливала на ріст коренів і їх екскреторну активність. Отже, використовуючи різні рослинні об'єкти і різні способи передпосівної обробки насіння пшениці та гороху можна отримувати кореневі екзометаболіти різного складу і в різній кількості.

Відомо, що мікроорганізми, які знаходяться в ризосфері і на поверхні насіння можуть впливати на екскреторну активність і склад корневих екзометаболітів. Визначення бактерій, які знаходяться на поверхні насіння пшениці і гороху різними методами (морфологічні, культивування на різних поживних середовищах, по тесту API, секвенування генів рРНК) було виявлено, що на насінні пшениці присутні *Pantoea agglomerans* strain C410P1 та *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25, на насінні гороху – *Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, та *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ33. Передпосівна обробка насіння пшениці перманганатом калію не впливала на видовий склад епіфітних мікроорганізмів. Однак, 2-й спосіб обробки насіння пшениці (етиловий спирт і гіпохлорит натрію) видаляв обидва види бактерій. Після обробки насіння гороху перманганатом калію з поверхні насіння вибірково віддалялися *Staphylococcus pasteurii*, Передпосівна обробка насіння гороху етиловим спиртом і гіпохлоритом натрію приводила до видалення тільки *Klebsiella pneumoniae*.

Отже, використання різних способів передпосівної обробки насіння пшениці та гороху дозволяє видаляти епіфітні мікроорганізми і регулювати кореневу екскрецію.

При перекресному внесення корневих екзометаболітів пшениці і гороху в чашки Петрі гороху і пшениці відповідно, було виявлено, що внесення КЕМ гороху, отриманих у 1 добових проростків, в культуру 1 добових проростків пшениці прискорювало ріст коренів пшениці на 31 % в порівнянні з контролем, а через 3 доби – навіть на 58 %. Внесення КЕМ пшениці, отриманих у 1 добових коренів пшениці, до 1 добових проростків гороху, також мало стимулюючий ефект на ріст коренів, проте він був виражений в меншій мірі, ніж вплив екзометаболітів гороху на корені пшениці. Цей стимулюючий ефект не залежав від способу передпосівної обробки насіння. Отже, кореневі екзометаболіти можна використовувати в якості стимуляторів росту проростків.

При використанні кореневих екзометаболітів пшениці та гороху в якості поживних середовищ для культивування різних мікроорганізмів було виявлено, що *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* не ростуть на кореневих екзометаболітах пшениці та гороху. Бактерії *Klebsiella pneumoniae* росли на чашках Петрі, які містили кореневі екзометаболіти пшениці і не росли на чашках Петрі, які містили кореневі екзометаболіти гороху. Слід зазначити, що площа колоній *Klebsiella pneumoniae* на МПА була більшою за площу їх колоній, які росли на КЕМ пшениці. Ріст ґрунтових мікроорганізмів роду *Bacillus* на поживних середовищах на основі кореневих екзометаболітів залежав від виду мікроорганізмів. *Bacillus licheniformis* та *Bacillus popilliae* росли на чашках Петрі, які містили кореневі екзометаболіти пшениці та гороху. У той час як *Bacillus cereus* росли на кореневих екзометаболітах гороху, а на кореневих екзометаболітах пшениці їх ріст був відсутнім. При цьому дані бактерії краще росли на МПА, ніж на кореневих екзометаболітах пшениці і гороху.

Однак при внесенні рідких культур екзогенних мікроорганізмів *Bacillus cereus* і *Bacillus popilliae* в культуру 1-добових проростків пшениці і гороху (в кількості 7 мл і 10 мл для пшениці і гороху відповідно) інгібували ріст проростків. Коріння пшениці мали більшу чутливість до негативного впливу даних бактерій. Також показано, що передпосівна обробка насіння різними способами не впливала на чутливість проростків пшениці гороху до внесення екзогенних культур *Bacillus* в чашки Петрі.

Було виявлено, що кореневі екзометаболіти 1-3-добових проростків пшениці мали виражену здатність до перехоплення вільних радикалів в системі *in vitro* і становила 40-60 %, що не поступалося прийнятому стандарту - етиловому спирту. Також кореневі екзометаболіти проростків пшениці мали виражену антиоксидантну активність, яка була всього на 25 % менше, ніж у відомого антиоксиданту  $\alpha$ -токоферолу, і антиоксидантна активність не розрізнялася у 1, 2 та 3-добових проростків.

В роботі перевіряли здатність корневих екзометаболітів пшениці впливати на регенерацію печінки щурів після часткової гепатектомії. Після часткової гепатектомії 3-місячним самцям щурів лінії Wistar вводили *per os* кореневі екзометаболіти пшениці через годину після операції. Було виявлено, що прийом корневих екзометаболітів пшениці приводив до збільшення питомої радіоактивності ДНК і РНК в клітинах печінки щурів. Так, питома радіоактивність ДНК в клітинах дослідних щурів була вищою в 7 разів при дозі КЕМ 0,1 мг / 100 г маси тіла ніж в контролі (часткова гепатектомії без корневих екзометаболітів). Збільшення дози корневих екзометаболітів до 0,5 мг / 100 г маси тіла приводило до прискорення синтезу ДНК в 8 разів у порівнянні з контролем. Введення корневих екзометаболітів тваринам після часткової гепатектомії в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла збільшувало швидкість синтезу і РНК в 3 рази в порівнянні з контрольною групою, а при введенні корневих екзометаболітів у дозі 0,5 мг / 100 г маси тіла швидкість синтезу РНК збільшувалася в 4,5 рази в порівнянні з контролем. Отже, кореневі екзометаболіти пшениці збільшували швидкість синтезу ДНК і РНК і мали виражений дозозалежний ефект.

Таким чином, КЕМ пшениці і гороху: різні за складом, їхній склад можна регулювати передпосівною обробкою насіння; передпосівна обробка насіння видаляє певні епіфітні мікроорганізми, які можуть впливати на екскрецію коренів; КЕМ пшениці та гороху мають різну біологічну активність, завдяки чому їх можна використовувати в різних галузях біотехнології.

**Ключові слова:** передпосівної обробка, екскреторна активність, епіфітні мікроорганізми, пшениця, горох.

## ABSTRACT

**ZAID ALI AZEEZ** The influence of pre-sowing seed treatment on the rhizosphere microbiota and excretory activity of seedlings. – Qualification

scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Speciality 03.00.20 – Biotechnology (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine; National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to study the influence of different methods of presowing treatment of seeds and peas on the growth rate of seedlings in aquatic culture, the qualitative and quantitative composition of root exometabolites from 1 to 3 days of seedling growth, in order to obtain them and evaluate their biological activity. As it is known, the root, in the process of life, releases from the environment from 40 % to 60 % of synthesizing organic substances. The composition of root exudates includes proteins, carbohydrates, lipids, free amino acids, vitamins and other biologically active compounds. As shown that root exudates are involved in the regulation of biological processes. Despite the possibility of using the seedlings as producers of biologically active compounds, such technologies are not exist. There are several reasons for this. During the cultivation of seedlings in an aquatic culture, contamination of root exudates takes place. The problem boils down to the fact that various microorganisms are always present on the surface of the seeds. Researchers are faced with the problem of removing epiphytic microflora. Moreover, in the composition of epiphytic microorganisms, microorganisms, exhibiting toxic properties, are often found. In this regard, a separate task in the development of root biotechnology is methods for developing pre-sowing seed treatment that can remove epiphytic microflora. However, it must be borne in mind that the removal of epiphytic microorganisms can affect the qualitative and quantitative composition of root exudates. In this sense, the development of root biotechnology requires a comprehensive solution to a number of interrelated issues. Along with this, an important aspect in obtaining root exudates is the selection of plant objects, since they can induce different metabolites with different biological activity into the environment.



In this study, two objects are selected - wheat and peas. Such a choice will allow us to establish the relationship between the type of root meristem and excreted root activity.

Accordingly, the aim of the work was to investigate the effect of pre-sowing seed treatment on the epiphytic microbiota, qualitative and quantitative composition of root exudates of wheat and pea seedlings and their biological activity.

In all experiments, different methods of presowing treatment of wheat seeds are used in this work:

The 1st method - the grains are soaked in a 0.05 % solution of sodium permanganate for 5 min, and then washed with sterile distilled water.

The 2nd and 3rd methods — grains are soaked in 70 % ethanol, washed with sterile distilled water, and then soaked in 5 % sodium hypochlorite. 2nd and 3rd methods differed in the time of soaking grains in these solutions.

Aqueous root exudates of wheat and pea are collected in a flow mode from 1st to 3rd day of cultivation.

The growth rate of wheat and pea seedlings from 1st to 3rd day is nonlinear, with a maximum specific growth rate on day 2 of growth. Pre-sowing treatment of wheat seeds in 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> methods led to stimulation of root sprout growth, in the case of peas, only 3<sup>rd</sup> method of pre-sowing treatment stimulated root growth.

When studying the quantitative and qualitative composition of aqueous root exudates of wheat and pea seedlings, it was found that the content of protein, free amino acids and carbohydrates in wheat exudates increased from 1st to 3rd day, while in peas it did not change or did not change significantly. Pre-sowing treatment of pea seeds did not affect the dynamics of the content of these components in the composition of aqueous root exudates of peas. Whereas the 3th method of pre-sowing treatment of wheat seeds led to a decrease in the content of carbohydrates and amino acids and an increase in the protein content in the composition of root exudates of wheat.

It was found that the total content of pea root exometabolites on the 1st day of seedling growth was 4 times higher than in wheat root exometabolites. Pre-sowing treatment of wheat seeds in 3<sup>rd</sup> method led to a decrease in total root exudates, and treatment of pea seeds to an increase, only on the 3rd day of growth. Aqueous root exudates of wheat were represented by 67 % carbohydrates, while aqueous root exudates of peas were represented by 85 % proteins. Only 3<sup>rd</sup> method of pre-sowing treatment of wheat seeds affected the ratio of proteins, carbohydrates and free amino acids in the composition of root exudates of wheat, in contrast to root exudates of pea.

It is known that borderline root cells play an important role in characterizing the excretory activity of roots, in particular, they make a significant contribution to excretory activity. Border cells of wheat and pea roots varied in size and shape. In the first day, wheat roots have about 100 cells per root are detected, while in peas, their number was about 1500 or more cells per root. This may explain the differences in the composition of the root exudates of wheat and peas. These results indicate a relationship between an organization such as the root meristem and the number of borderline root cells.

Thus, the same type of pre-sowing treatment of wheat and pea seeds had different effects on root growth and their excretory activity. Therefore, using different plant objects and different methods of pre-sowing treatment of wheat and pea seeds, root exudates of different compositions and in different quantities can be obtained.

It is known that microorganisms, which are in the rhizosphere and on the surface of the seeds, can affect the excretory activity and composition of root exudates. Determination of bacteria that are on the surface of wheat and pea seeds using different methods (morphological, cultivation on different nutrient media, API test, rRNA gene sequencing). It was found that wheat seeds are present *Pantoea agglomerans* strain C410P1 and *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25, with peas, respectively: *Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, and *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ33.

Pre-sowing treatment of wheat seeds with potassium permanganate did not affect the species composition of epiphytic bacteria. However, the second method of treating wheat seeds (ethyl alcohol and sodium hypochlorite) removed both types of bacteria. After treating pea seeds with potassium permanganate, *Staphylococcus pasteurii* was selectively removed from the surface of the seeds. Pre-sowing treatment of pea seeds with ethyl alcohol and sodium hypochlorite removed only *Klebsiella pneumoniae*.

Therefore, the use of different methods of pre-sowing treatment of wheat and pea seeds allows you to remove epiphytic microorganisms and regulate root excretion.

When the root exudates of wheat and peas were cross-applied in Petri dishes of peas and wheat, respectively, it was found that the introduction of pea root exudates obtained from 1 daily seedling into the culture of 1 daily wheat seedlings accelerated wheat root growth by 31 % compared to the control, and later 3rd day, even 58 %. The addition of wheat exudates obtained from 1 daily wheat roots to 1 daily pea seedlings also had a stimulating effect on root growth, however, it was less pronounced than the effect of pea exudates on wheat roots. This stimulating effect did not depend on the method of pre-sowing treatment of seeds. Therefore, root exudates can be used as seedlings growth stimulants.

When using wheat and pea root exudates as culture media for culturing various microorganisms, it was found that *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* do not grow on wheat and pea root exudates. *Klebsiella pneumoniae* bacteria grew on Petri dishes containing root exudates of wheat and did not grow on Petri dishes containing root exudates of peas. It should be noted that the area of colonies of *Klebsiella pneumoniae* on MPA was larger than the area of their colonies growing on root exudates of wheat. The growth of soil microorganisms of the genus *Bacillus* on nutrient media based on root exometabolites depended on the type of microorganisms. *Bacillus licheniformis* and *Bacillus popilliae* grew on Petri dishes containing root exometabolites of wheat and peas. While *Bacillus cereus* grew on pea root exometabolites, their growth was absent on wheat root

exometabolites. Moreover, these bacteria grew better on MPA than on root exometabolites of wheat and pea.

However, when liquid cultures of exogenous microorganisms *Bacillus cereus* and *Bacillus popilliae* were introduced into the culture of 1-day-old wheat or pea seedlings (in the amount of 7 ml and 10 ml for wheat and pea, respectively), it inhibited the growth of seedlings. Wheat roots were more sensitive to the negative effects of these bacteria. It was also shown that pre-sowing seed treatment in different ways did not affect the inhibitory effect of exogenous *Bacillus* cultures for both wheat seedlings and pea seedlings.

It was found that root exudates of 1-3-day-old wheat seedlings had a pronounced ability to intercept free radicals in the in vitro system, which was 40-60 %, which was not inferior to the accepted standard - ethyl alcohol. Also, root exudates of wheat seedlings had a pronounced antioxidant activity, which was only 25 % less than the known antioxidant  $\alpha$ -tocopherol, and antioxidant activity did not differ in 1, 2 and 3 days-old seedlings.

The ability of root exudates of wheat to affect liver regeneration of rats after partial hepatectomy was tested. After partial hepatectomy, 3-month-old male Wistar rats were administered *per os* root wheat exudates one hour after surgery. It was found that taking root exudates of wheat led to an increase in the specific radioactivity of DNA and RNA in rat liver cells. Thus, the specific radioactivity of DNA in the cells of experimental rats was 7 times higher than the control (partial hepatectomy without root exudates) at a dose of 0.1 mg / 100 g body weight. An increase in the dose of root exudates to 0.5 mg / 100 g of body weight led to an acceleration of DNA synthesis by 8 times compared to the control. Administration of root exudates to animals after partial hepatectomy at a dose of 0.1 mg / 100 g body weight increased the rate of synthesis and RNA by 3 times compared with the control group, and with the introduction of root exudates at a dose of 0.5 mg / 100 g body weight, the synthesis rate RNA increased by 4.5 times compared with the control. Therefore, root exudates of wheat increased the rate of DNA and RNA synthesis and had a pronounced dose-dependent effect.

Thus, the root exudates of wheat and peas: different in composition, their composition can be regulated by pre-sowing seed treatment; pre-sowing seed treatment removes certain epiphytic microorganisms that can affect root excretion; the root exudates of wheat and peas have different biological activity, so they can be used in different fields of biotechnology.

**Key words:** pre-sowing treatment, excretory activity, epiphytic microorganism, wheat, pea.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Публікація в науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science:*

1. Bozhkov A. I., Kovalova M. K., **Azeez Z. A.**, Goltvjansky A. V. The effect of pre-sowing seed treatment on seedlings growth rate and their excretory activity // Regulatory mechanism in biosystem. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 60 – 66. (Web of Science). *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання кореневих екзометаболітів, участь у написання статті).*

*Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:*

2. Kuznetsova Yu. A., Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Goltvyansky A. V., **Azeez Zaid Ali** Root exudates of wheat seedlings express antibacterial and antioxidant activity and stimulate proliferation of liver cells // Indian Journal of Natural Products and Resources. 2018. Vol. 9(4). P. 303 – 310. (SCOPUS). *(Особистий внесок здобувача: отримання кореневих екзометаболітів проростків пшениці, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову).*

3. Kovalova Marina Konstantinovna, **Azeez Zaid Ali**, Bozhkov Anatoliy Ivanovich and Kuznetsova Yuliya Aleksandrovna Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // Plant Archives. 2020. Vol. 20, Supplement 1. P. 3041 – 3049. (Konstantinovna K. M., Ali A. Z., Ivanovich B. A., Aleksandrovna K. Y. Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // 2020. Vol. 20. P. 3041-3049. (SCOPUS). *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі,*

визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання кореневих екзометаболітів, участь у написання статті).

*Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях:*

4. **Azeez Zaid**, Kovalova M., Bozhkov A. Effects of pre-sowing seed treatment on the growth rate of seedlings and the activity of the excretory system of the wheat root in aquatic culture // International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 2018. Vol. 11(3). P. 589 – 599. *(Особистий внесок здобувача: обробка насіння гороху різними способами, культивування проростків гороху у проточному режимі, збір кореневих екзометаболітів, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову).*

5. **Azeez Z. A.**, Bozhkov A. I., Mahmood M. T., Kovalova M. K. The species composition of epiphytic microorganisms and their influence on roots excretory activity of wheat and pea seedlings // Biochem. Cell. Arch. 2019. Vol. 19, No. 2. P. 3809 – 3818. *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, визначення мікроорганізмів, які знаходилися на поверхні зерен, проведення мікроскопічних, біохімічних тестів, участь у написання статті).*

*Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:*

6. **Azeez Z. A.**, Chumbash K. V. The influence of different methods of pre-sowing seeds process on root growth and on the microbes's composition of wheat seedling // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances : XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, 18 – 21 квітня 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 8. *(Особистий внесок здобувача: визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір 2-добових кореневих екзометбаолітів проростків пшениці, культивування їх на МПА, написання тез).*

7. **Azeez Z. A.** Multiple diagnosis of bacteria that live on the surface of wheat seeds // Біотехнологія: Звершення та Надії : VI науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 120-річниці НУБіП України, 14 – 16 листопада 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 270.

8. **Azeez Z., Kovalova M.** The characteristics of the excretory system of wheat roots in the early stages of growth (1 st – 3 rd day) // Молодь і поступ біології : XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, 10 – 12 квітня 2018 р.: тези доп. Львів, 2018. С. 127 – 128. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен пшениці та гороху різними способами, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір кореневих екзометаболітів, участь у написанні тез).*

9. Ковальова М. К., **Азіз З. А.** Вплив передпосівної обробки насіння гороху на склад водних корневих екзометаболітів // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві : матеріали XIII наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України, 24 – 25 жовтня 2018 р. Чернігів, 2018. С. 160 – 162. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, збір корневих екзометаболітів проростків гороху з 1 по 3 добу росту, участь у написанні тез).*

10. **Azeez Z. A., Kovalova M. K., JEBUR A. M.** The removal of pathogenic microorganisms from the surface of pea grain depends on the method of treating seeds // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7 – 8 листопада 2018 р. Вінниця, 2018. С. 133 – 134. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, проведення мікроскопічних тестів, культивування мікроорганізмів на різному середовищі, проведення тесту API, участь у проведенні молекулярних тестів, участь у написанні тез).*



11. **Azeez Z. A.**, Kovalova M. K., Mahmood M. T. The use of root exudates as a nutrient medium for some types of bacteria // Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського: матеріали науково-практичної конференції, 12 лютого 2020 р. Харків, 2020. С. 59 – 60. (*Особистий внесок здобувача: отримання корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, культивування мікроорганізмів на твердому середовищі, яке виготовлено на основі корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, участь у написанні тез*).

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕКСКРЕТОРНОЇ СИСТЕМИ	22
КОРЕНЯ (літературний огляд).....	29
1. 1 Характеристика кореневої системи.....	29
1. 2 Певні характеристики корневих екзометаболітів.....	32
1. 3 Механізми виділення корневих екзометаболітів.....	34
1. 4 Характеристика ризосфери кореня.....	39
1. 5 Мікроорганізми ризосфери.....	41
1. 6 Вплив передпосівної обробки на проростання насіння та ріст рослин.....	44
1. 7 Роль гормезиса при формуванні відповідної реакції рослин на дію стрес-факторів.....	46
Висновки до розділу 1.....	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2. 1 Об'єкти дослідження.....	50
2. 2 Способи передпосівної обробки насіння.....	50
2. 3 Визначення схожості насіння та швидкості росту проростків коренів.....	52
2. 4 Збір та характеристика корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху.....	52
2. 4. 1 Визначення вмісту загального білка.....	53
2. 4. 2 Визначення вмісту загальних вуглеводів.....	53
2. 4. 3 Визначення вмісту амінокислот.....	53
2. 4. 4 Збір та визначення кількості прикордонних клітин кореня.....	54
2. 5 Культивування корневих екзометаболітів на	

універсальному живильному середовищі.....	54
2. 6 Визначення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху після різних способів передпосівної обробки.....	55
2. 6. 1 Культивування мікроорганізмів-епіфітів пшениці та гороху на твердих поживних середовищах.....	56
2. 6. 2 Мікроскопічний тест.....	56
2. 6. 3 Ідентифікація бактерій за індексом аналітичного профілю (API) 20E.....	56
2. 6. 4 Молекулярні тести.....	58
2. 6. 4. 1 Виділення та аналіз ДНК бактерій.....	59
2. 6. 4. 2 Електрофорез ДНК в агарозному гелі.....	61
2. 6. 4. 3 Полімеразна ланцюгова реакція ДНК (ПЛР).....	62
2. 6. 4. 4 Секвенирование ДНК.....	64
2. 7 Оцінка біологічної активності корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху.....	64
2. 7. 1 Оцінка антиоксидантних властивостей КЕМ пшениці.....	64
2. 7. 2 Вплив КЕМ пшениці на швидкість синтезу ДНК і РНК в клітинах печінки щурів після часткової гепатектомії.....	65
2. 7. 3 Використання КЕМ пшениці та гороху в якості поживного середовища для росту різних видів бактерій.....	66
2. 7. 4 Використання КЕМ пшениці та гороху в якості середовища проростання для гороху та пшениці відповідно.....	67
2. 7. 5 Використання рідких ґрунтових культур мікроорганізмів в якості середовища проростання для насіння пшениці та гороху.....	68
2. 8 Статистична обробка.....	69
Висновки до розділу 2.....	69
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.....	71

3. 1 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на інтенсивність росту проростків та активність екскреторної системи кореня у водній культурі.....	71
3. 1. 1 Вплив різних способів обробки насіння на схожість та інтенсивність росту коренів пшениці.....	71
3. 1. 2 Якісний та кількісний склад кореневих екзометаболітів після різних способів передпосівної обробки насіння пшениці.....	75
3. 1. 3 Вплив передпосівної обробки насіння на кількість мікроорганізмів у 2 добових проростків пшениці у водній культурі.....	82
3. 1. 4 Вплив різних способів обробки насіння на схожість та інтенсивність росту кореня гороху.....	88
3. 1. 5 Якісний та кількісний склад кореневих екзометаболітів після різних способів передпосівної обробки насіння гороху.....	91
3. 1. 6 Вплив передпосівної обробки насіння на кількість мікроорганізмів у 2 добових проростків гороху у водній культурі.....	96
3. 1. 7 Порівняння впливу передпосівної обробки на проростання і ріст коренів проростків пшениці та гороху.....	98
3. 1. 8 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на характеристику прикордонних клітин.....	103
3. 2 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на видовий склад епіфітних мікроорганізмів.....	105
3. 2. 1 Визначення мікробіоти на поверхні насіння пшениці та гороху після контрольного варіанту передпосівної обробки..	105
3. 2. 2 Вплив передпосівної обробки насіння розчином перманганату калію, етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію на видовий склад мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та	

	20
гороху.....	109
3. 3 Оцінка біологічної активності корневих екзометаболітів...	115
3. 3. 1 Вплив корневих екзометаболітів гороху на інтенсивність росту коренів пшениці та екзометаболітів пшениці на інтенсивність росту гороху.....	115
3. 3. 2 Результати використання КЕМ як поживних середовищ для культивування мікроорганізмів.....	117
3. 3. 3 Використання впливу деяких представників ризосферних мікроорганізмів на ріст проростків пшениці та гороху при різних способах передпосівної обробки насіння.....	121
3. 3. 4 Антиоксидантна та антирадикальна активність корневих екзометаболітів проростків пшениці в системі <i>in vitro</i> .....	124
3. 3. 5 Вплив КЕМ проростків пшениці на регенерацію печінки щурів після часткової гепатектомії.....	126
Висновки до розділу 3.....	129
ВИСНОВКИ.....	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	135
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	164
ДОДАТОК 2 .....	168

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

KEM – кореневі екзометаболіти

ДНК – дезоксірібонуклеїнова кислота

РНК - рібонуклеїнова кислота

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ALMT – алюмінієво-активовані малатні транспортери (aluminum-activated-malate transporters)

SLAC – повільні аніонні канали (slow anion channels)

QUAC – швидкі аніонні канали (quick anion channels)

ABC – АТФ-зв'язуючі касетні транспортери (ATP-binding cassette transporters)

MATE – екструзія багатолікарських та токсичних сполук (multidrug and toxic compound extrusion)

MFS – основний фасилітатор транспортних засобів сімейства (the major facilitator superfamily transporters)

PGPR – ризобактерії, які стимулюють ріст рослин (plant growth-promoting rhizobacteria)

AMF – мікоризні арбускулярні гриби (mycorrhizal arbuscular fungi)

VAM – везикулярний арбускулярний мікориза (vesicular arbuscular mycorrhiza)

ECM – ектомікориз (ectomycorrhizal)

МПА – м'ясо-пептонний агар (meat-peptone agar)

API 20E – аналітичний індекс профілю 20E тест (analytical profile index) 20E test

BLAST – базовий інструмент пошуку локального вирівнювання (basic Local Alignment Search Tool)

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Отримання біологічно активних сполук є однією з найважливіших задач сучасної біотехнології. Вони використовуються в фармації, сільському господарстві, при розробці біосенсорів, як регулятори росту [25, 45, 47, 207, 210]. Найчастіше в якості біологічно активних сполук використовують різноманітні метаболіти тваринних, рослинних та бактеріальних клітин [109, 247, 255]. Однак, отримання клітинних метаболітів вимагає виконання ряду складних та дорогих процедур: руйнування клітин, екстракція, очищення, ідентифікація та стабілізація цільового продукту. Поряд з цим в процесі життєдіяльності біологічні системи екскретують цілий ряд екзометаболітів в середовище [128, 205]. Найбільшою мірою екскреторний апарат розвинений у вищих рослин, зокрема, екскреторний апарат кореневої системи. Показано, що корінь виділяє в середовище від 30 до 60 % органічних сполук, що утворюються в процесі фотосинтезу [73, 118]. Іншою найважливішою особливістю екскреторної системи коренів є наявність видової специфічності екзометаболітів, що екскретуються. Вперше на це звернув увагу Hans Molisch у 1937 році, описавши явище «алелопатія» [176]. Дослідженню особливостей механізмів екскреторної активності кореневої системи було приділено велику увагу. Суттєвий внесок в цей науковий напрям внесли українські вчені, зокрема, школа Гродзинського М. Д. [1]. Було показано, що до складу корневих екзометаболітів (КЕМ) входять білки, пептиди, вільні амінокислоти, цукри, фенольні та ліпідні сполуки, вітаміни та рослинні гормони [165, 195, 265]. Склад екзометаболітів залежить від видового складу рослин, умов та стадії розвитку рослин [146, 148, 187]. Виходячи з цього, при культивуванні рослин у водній культурі можна отримати різноманітні екзометаболіти, при цьому немає необхідності в руйнуванні та екстракції екзометаболітів. Незважаючи на ці переваги, поки відсутні біотехнології отримання та використання корневих екзометаболітів. Це можна пояснити

кількома причинами: залишаються мало дослідженими механізми регуляції екскреторної активності, зокрема, їх особливості у рослин з «закритою» (пшениця) та «відкритою» (горох) кореневою меристемою, вплив мікробіоти на екскреторну активність та наявність супутніх мікроорганізмів на насінні рослин. Як відомо, мікробіота дуже впливає як на систему екскреції, так і на склад корневих екзометаболітів, які одержують. Слід зазначити, що серед супутніх мікроорганізмів можуть бути патогенні та умовно-патогенні для людини види мікроорганізмів. У зв'язку з цим, виникає необхідність в дослідженні мікробіоти кореневої ризосфери та епіфітних мікроорганізмів у представників з «закритим» типом меристеми, зокрема, у пшениці та у представників з «відкритим» типом меристеми, представником яких є горох. Для видалення епіфітних мікроорганізмів використовують різні способи передпосівної обробки насіння.

У зв'язку з цим, були досліджені різні способи передпосівної обробки насіння пшениці та гороху, які можуть забезпечувати видалення епіфітних мікроорганізмів та впливати на особливості екскреції корневих екзометаболітів проростків на початкових етапах росту для отримання біологічно активних сполук.

**Мета та завдання дослідження.** Дослідити вплив передпосівної обробки насіння на епіфітну мікробіоту, якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху і їх біологічну активність.

Для реалізації поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Визначити вплив трьох способів передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на схожість та інтенсивність росту проростків пшениці та гороху.
2. Дослідити вплив передпосівної обробки насіння на епіфітний склад мікроорганізмів насіння пшениці та гороху.
3. Проаналізувати вплив бактерій роду *Bacillus* на ріст проростків пшениці та гороху.
4. Отримати водневі кореневі екзометаболіти проростків пшениці та



гороху з 1 по 3 добу їх росту й оцінити вплив трьох способів передпосівної обробки насіння пшениці на якісний і кількісний склад корневих екзометаболітів

5. Дослідити біологічну активність корневих екзометаболітів пшениці на інтенсивність росту мікроорганізмів з метою їх використання в якості поживного середовища, в якості стимуляторів росту проростків пшениці та гороху в водній культурі і як стимуляторів регенерації печінки у експериментальних тварин.

6. Визначити кількість прикордонних клітин у 1-добових проростків пшениці та гороху.

7. Проаналізувати вплив перехресного внесення корневих екзометаболітів пшениці та гороху на інтенсивність росту проростків пшениці та гороху.

- *об'єкт дослідження* – коренева екскреція паростків насіння пшениці (*Triticum aestivum*) та насіння гороху (*Pisum sativum*) з 1 по 3 добу росту у водневій культурі та епіфітна мікрофлора насіння пшениці та гороху;

- *предмет дослідження* – показники кореневої екскреції паростків насіння пшениці та гороху (вміст загального білка, вуглеводів та вільних амінокислот) та вплив передпосівної обробки насіння на показники кореневої екскреції та на склад епіфітної мікрофлори насіння після різних способів передпосівної обробки.

**Методи дослідження.** Проточне культивування проростків пшениці та гороху у водній культурі, препаративні (виділення прикордонних клітин, збір водневих корневих екзометаболітів), спектрофотометричні (визначення вмісту загального білка, вуглеводів, вільних амінокислот, антиоксидантної й антирадикальної активності корневих екзометаболітів), мікроскопічні методи (визначення морфології мікроорганізмів, визначення кількості прикордонних клітин), молекулярні методи (виділення ДНК мікроорганізмів, проведення полімеразної ланцюгової реакції, електрофорез ДНК, секвенування ДНК), методи культивування бактерій (на універсальних

поживних рідких та твердих середовищах, на середовищах, виготовлених з корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху), радіоактивні методи (визначення швидкості синтезу ДНК і РНК), методи обробки даних (визначення площі колоній бактерій за допомогою програми Axio vision 4.6.3 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH), використання методу непараметричної статистики (критерій Манні – Уїтні) з використанням пакету програм «Statistika V.6»).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показано, що передпосівна обробка насіння пшениці та гороху (перманганатом калію, етиловим спиртом, гіпохлоритом натрію) приводила до стимуляції інтенсивності росту проростків (гормезісний ефект), що більшою мірою проявлялося для насіння гороху.

Вперше показано, що основна кількість корневих екзометаболітів пшениці – це вуглеводи (до 50 – 67 % від загальної кількості), тоді як у гороху 80 – 85 % екзометаболітів становили білки. Показано, що інтенсивність екскреції корневих екзометаболітів (КЕМ) у пшениці («закритий» тип меристеми) майже лінійно збільшувалася з 1 по 3 добу, тоді як у гороху («відкритий» тип меристеми) вона була вищою та залишалася незмінною з 1 по 3 добу росту. Кількість корневих екзометаболітів пшениці на 3 добу росту становила 5,9 мкг / 100 зерен, а КЕМ гороху – 7,1 мкг / 100 зерен.

Показано, що динаміка екскреторної активності для коренів з «закритим» і «відкритим» типом меристеми була різною, як і кількість прикордонних клітин коренів. Якщо в ризосфері 1-добових проростків пшениці було виявлено близько 100 прикордонної клітин на 1 корінь, то у гороху – понад 1000 клітин на 1 корінь.

Вперше показано, що передпосівна обробка насіння пшениці (1 та 2 способами) збільшувала кількість метаболітів, які екскретуються в середовище, на 25 % та 20 % відповідно, а передпосівна обробка насіння гороху (3-м способом) – на 42 % в порівнянні з 1 добою росту, що може

збільшувати вихід цільового продукту.

Вперше показано, що склад епіфітних мікроорганізмів насіння пшениці (мікроорганізми, які неможна видалити промиванням насіння проточною водою) представлено двома видами бактерій (*Pantoea agglomerans* strain C410P1, *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25), а гороху – чотирма (*Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ3), при цьому два з них є патогенними видами. Передпосівна обробка насіння пшениці (70 % етиловим спиртом  $C_2H_5OH$ , 5 % гіпохлоритом натрію  $NaOCl$ ) інактивувала епіфітні мікроорганізми, а інактивацію епіфітних мікроорганізмів гороху забезпечує використання двох видів послідовної обробки насіння (0,05 % розчином перманганатом калію і 70 % етиловим спиртом  $C_2H_5OH$ , 5 % гіпохлоритом натрію  $NaOCl$ ), що необхідно при отриманні корневих екзометаболітів.

Вперше показано, що КЕМ пшениці мали антиоксидантну, антирадикальну активність та прискорювали пролиферативну активність клітин печінки після часткової гепатектомії у щурів. Перехресне внесення корневих екзометаболітів до проростків пшениці та гороху мало стимулюючий ефект на ріст проростків. Показано, що КЕМ проростків пшениці та гороху можна використовувати в якості поживних середовищ для росту різних видів мікроорганізмів.

**Біоетична експертиза.** Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів з відповідними законами України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 9 від 17 жовтня 2019 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено аналіз наукових літературних першоджерел за темою дисертації, виконані експериментальні дослідження, проведено статистичні розрахунки, написано

та оформлено розділи дисертації, переведено власні публікації англійською мовою. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф., директором НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна Божковим А. І. Експерименти щодо вивчення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху виконано спільно з центром Wahj Al DNA в Багдаді (Ірак), визначення антирадикальної та антиоксидантної активності кореневих екзометаболітів проростів пшениці виконано спільно з працівниками відділу молекулярної біології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances» (Київ, 2017); VI науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 120-річниці НУБіП України «Біотехнологія: Звершення та Надії» (Київ, 2017); XIV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, присвяченій 185 річниці від дня народження Б. Дибовського «Молодь і поступ біології» (Львів, 2018); XIII науковій конференції молодих вчених, присвяченій 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (Чернігів, 2018); V Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, 2018); науково-практичній конференції «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» (Харків, 2020).

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 168 сторінок, з них основного тексту 118 сторінок. Робота ілюстрована 38 рисунками та 11 таблицями.

Список використаних джерел містить 277 найменування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана у відділі клітинної біології та біотехнології Науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна відповідно до НДР «Розробка концепції «динамічних функціональних мереж» на рослинних і тваринних моделях», державний реєстраційний номер №0115U000485.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено способи передпосівної обробки насіння для пшениці і гороху, які забезпечують видалення епіфітних мікроорганізмів. Ці способи передпосівної обробки насіння прискорюють інтенсивність росту проростків і збільшують екскреторну активність, що дозволяє їх використовувати в корневих технологіях при отриманні біологічно активних сполук. Ефект стимуляції росту проростків пшениці і гороху при перехресному внесенні підтверджує гіпотезу авторегуляції в системі «корінь ↔ мікрооточення» і може бути використано в корневих технологіях. Поліфункціональність біологічної дії корневих екзометаболітів показана на мікроорганізмах, вищих рослинах і тваринах, яка може знайти застосування на практиці.

Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці практичних робіт з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Загальна мікробіологія і вірусологія» для студентів біологічного факультету кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні вищої освіти.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕКСКРЕТОРНОЇ СИСТЕМИ КОРЕНЯ

(літературний огляд)

#### 1. 1 Характеристика кореневої системи

Корінь – підземний вегетативний орган, який має радіальну симетрію, необмежений верхівковий ріст в довжину та здатний до розгалуження. Вперше в еволюції коріння утворилися у плаунів, але найвище диференціювання та спеціалізацію вони досягли у насінних рослин. Головний корінь утворюється із зародкового корінця насіння і по суті є продовженням стебла. На корені виділяють кілька зон: 1 - зона кореневого чохла, 2 - зона поділу клітин, 3 - зона розтягування клітин, 4 - зона всмоктування, 5 - провідна зона (зона бічних коренів) [57, 94, 181, 200, 234, 235, 239] (Рис. 1.1).

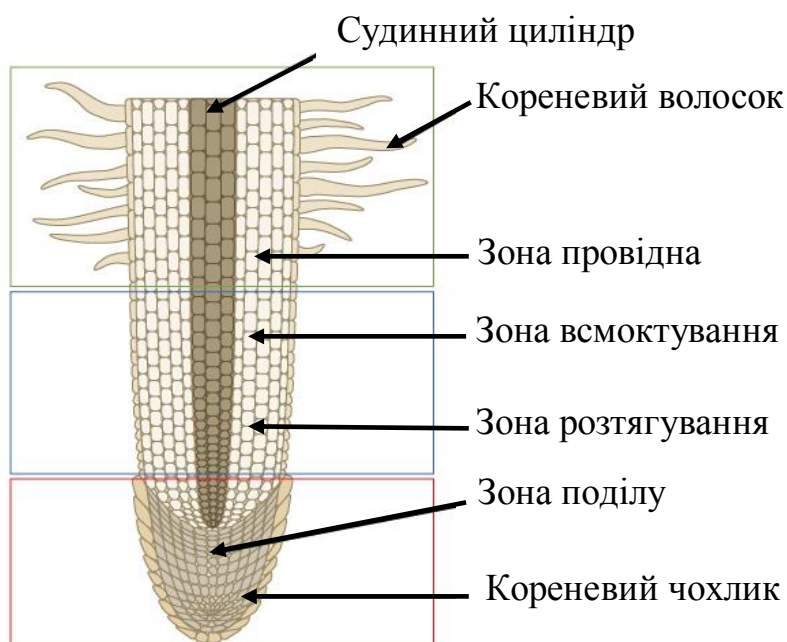


Рис 1.1 Поздовжній вид кореня показує зони відповідно до функцій клітин кореня

У багатьох рослин поверхня кореневої системи трохи перевищує надземну частину (у жита в 130 разів). Як відомо, коренева система забезпечує рослину водою та мінеральними речовинами, регулює «взаємини» у рослинному співтоваристві. При цьому корінь не тільки забезпечує поглинання різних сполук, але і виділяє в середовище від 30 до 50 % речовин, що утворюються в результаті фотосинтезу [73, 92, 189, 197, 202, 226]. У результаті життєдіяльності корінь формує специфічну ризосферу, яка визначає особливості розвитку рослин. В цьому відношенні цікавим є таке явище, як «аллелопатія» [94, 112, 139].

Аллелопатія це феномен, або екологічний механізм, який відіграє особливу роль в екосистемах та агроекосистемах, опосередковується виділенням вторинних метаболітів рослин, продуктів життєдіяльності або відмиранням мікроорганізмів у повітряне або ґрунтове середовище [20, 90].

Вперше цей термін був введений німецьким вченим Hans Molisch в 1937 році [176]. Цей термін походить від грецького слова *allelon* - «взаємно» та *pathos* - «страждання». Hans Molisch визначив це явище як види біохімічного взаємовпливу видами рослин, з одного боку, і між іншими рослинами та мікроорганізмами, з іншого боку [17, 76, 105, 184].

Деякі фахівці розуміють під цим явищем тільки негативні ефекти рослини на інші рослини або мікроорганізми, в той час як інші відносять це явище до негативних та позитивних ефектів рослини [177, 212].

Протягом останніх десятиліть було проведено багато досліджень, присвячених вивченню цього явища, та вони показали важливу роль аллелопатії в природних екосистемах та сільськогосподарських екосистемах. [126, 184, 254]. У природних системах аллелопатія забезпечує формування рослинних угруповань [227, 245]. Пропонують використовувати аллелопатичні сполуки в якості препаратів-пестицидів, бо ці сполуки містять у своєму складі речовини, які впливають на життєдіяльність комах та мікроорганізмів. Таке застосування аллелопатичних сполук дозволить

зменшити використання хімічних пестицидів, шкідливих для навколишнього середовища та здоров'я людини. [32, 218].

Властивості та природа аллелопатичних сполук, які виділяються рослинами, різні. Більшість досліджень показали, що це хімічні сполуки фенольної природи, вуглеводи, амінокислоти, білки та інші метаболіти [167, 232].

Явище аллелопатія відіграє важливу роль у загальній екосистемі та пов'язане з виділенням фітотоксичних сполук, які, в свою чергу, є вторинними метаболітами [99, 250]. Листя і коріння є основними джерелами аллелопатичних сполук, але ці речовини виділяються також стеблами, квітами, плодами [125, 199].

Показано, що аллелопатичні речовини виводяться або виділяються частинами рослин чотирма способами. Перший спосіб опосередкований розкладанням рослинних залишків після його відмирання, це важливе джерело для вивільнення аллелопатичних сполук у навколишнє середовище. Другий спосіб пов'язаний з відділенням частин рослин у процесі його росту в ґрунт. Це залежить від кліматичних умов, температури, вологості та інших кліматичних чинників. По-третє, аллелопатичні з'єднання вивільняються шляхом випаровування через пори на поверхнях листя або з квітів. По-четверте, рослини вивільняють або виділяють кореневі екзометаболіти в навколишній ґрунт, що є основним джерелом вивільнення аллелопатичних сполук, оскільки вони безпосередньо впливають на корені інших рослин в ризосфері та на інші мікробні спільноти, присутні в цьому ґрунті [78, 139, 216, 218, 223, 240].

Поряд з цим, аллелопатичні речовини, які виділяються кореневою системою, можуть знайти широке застосування в якості біологічно активних сполук [27]. Найбільш цікавим в цьому відношенні є коріння злакових та бобових рослин на початкових етапах росту.



## 1. 2 Певні характеристики корневих екзометаболітів

Кореневі екзометаболіти – це група хімічних сполук, які виділяються корінням рослин в ризосферу. Ці сполуки забезпечують безліч різних хімічних, екологічних та фізичних взаємодій між корінням самої рослини та корінням інших рослин, та мікроорганізмами в навколишньому середовищі [104, 141, 194, 264]

Секреція цих корневих ексудатів залежить головним чином від видового складу рослин, їх віку, метаболічних особливостей рослин, структури кореневої системи, а також умов навколишнього середовища, пов'язаних з ростом рослин. Кількісний та якісний склад корневих екзометаболітів може варіювати в залежності від оточуючих умов, наприклад від складу ґрунту [119, 160, 193, 265].

Кореневі екзометаболіти виконують ряд важливих функцій, беруть участь в хімічній комунікації та опосередковують багато біологічних реакцій, оскільки вони містять велику кількість складних молекулярних мереж [106, 142, 222]. Секреція коренів регулює зв'язок між рослинними мікроорганізмами, сприяє різним симбіотичним взаємодіям, пригнічує ріст інших рослин і покращує хімічні та фізичні властивості ґрунту [33, 43, 111, 124, 150, 252, 262].

Кореневі екзометаболіти являють собою суміш найрізноманітніших сполук, до складу яких входять первинні і вторинні метаболіти [122, 155, 185]. До первинних метаболітів відносять вуглеводи, амінокислоти та органічні кислоти. До вторинних метаболітів відносять такі речовини як флавоноїди, глюकोзинолати, ауксини та інші. Відомо, що первинні метаболіти виділяються в більшій кількості, ніж вторинні метаболіти [38, 74, 96, 251, 255].

Також сполуки корневих ексудатів можна розділити на два типи сполук в залежності від їх молекулярної маси. Перший тип речовин це низькомолекулярні сполуки, до яких відносять іони, молекули вільного

кисню, молекули води, амінокислоти, моносахариди, вітаміни та органічні кислоти. До другого типу речовин відносять високомолекулярні сполуки - флавоноїди, жирні кислоти, гіберлін, білки та інші [154, 155, 195, 198, 221] (Табл. 1.1).

Таблиця 1.1

**Сполуки, що виділяються корінням рослин**

Хімічні сполуки	Назва хімічних сполук
Вуглеводи	арабиноза, глюкоза, фруктоза, галактоза, мальтоза, рафіноза, рамноза, рибоза, сахароза, ксилоза, олігосахарид, манноза, слиз різних складів, дезоксирибоза
Амінокислоти й аміди	всі 20 протеїногенних амінокислот, аміномасляна кислота, цистатіонін, фітосідефори мугінової кислоти, $\alpha$ -аланін, $\beta$ -аланін, $\gamma$ -аміномасляної, $\alpha$ -аміноадіпічний, цитрулін, цистатіонін, дезоксімугіновий, 3-епігідроксімугіновий, мугіновий, орнітин, гліцин, гомосерін
Органічні кислоти	оцтова, аконітова, аскорбінова, альдоніческа, масляна, бензойна, кавова, лимонна, ізоцітарна, ферулова, мурашина, фумарова, галльська, гентізічна, глутарова, глюконова, гліоксильна, гліколева молочна, малеїнова, малінова, щавлева, оксалоглутарова, щавлева, пропіонова, піровиноградна, п-кумарова, сінапіческа, п-гідроксибензойна, протокатехіческа, піцидний, хінний шприц, саліциловий, шікімовий, бурштиновий, винний, тетровий, ванільний валеріановий.
Феноли	флаванол, флаволи, ацетосірінгон, флаванолли, антоціани, ізофлавоноїди, халкони, кумарин
Жирні кислоти	лінолева, ліноленова, олеїнова, пальмітинова, стеаринова кислоти

*Продовження таблиці 1.1*

Ферменти і білки	амілаза, інвертаза, фосфатаза, протеаза, полігалактуранози, інвертаза, фосфатаза, гідролаза, лектин, амілаза, пероксидаза, фенолаза, кислотна / лужна фосфатаза
Гормони	етилен і його попередник 1-аміноціклопропан-1-карбонова кислота, путресцин, жасмонат, саліцилова кислота
Фактори росту і вітаміни	п-аміно-бензойна кислота, біотин, холін, н-метіоніл-нікотинова кислота, ніацин, пантотенат, піридоксин, рибофлавін, тіамін, інозит, N-метілнікотінова кислота, ніацин, патоген, стріголактони, ауксини
Стерини	кампестерол, холестерин, ситостерин, стигмастерин
Нуклеотиди / пурини:	аденін, гуанін, уридин / цитидін
інші сполуки	Al-індуковані поліпептиди, спирти, алкілсульфіди, етанол, камалексін, дігідрохінон, глюкозиди, ксантони, імітатори, глюкозинолати, гліцинбетаїн, синильна кислота, калістеїн, неорганічні іони, газоподібні молекули (наприклад, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), ізотіоціанати, неідентифіковані нінгідрини, відновлювальні з'єднання, сорголеон, неідентифікованих ацил гомосерин, лактон, сапонін, ськополетін, активні форми кисню, трігонеллін, стріголактони

### 1. 3 Механізми виділення корневих екзометаболітів

У процесі життєдіяльності корінь формує в своєму оточенні специфічну боігенну середу завдяки метаболітам, які виділяються в ризосферу [14, 83, 134]. Кореневі екзометаболіти рослин створюють сприятливі умови для росту рослини, а також впливають на процеси адаптації рослин до несприятливих умов середовища. Вони можуть:

змінювати рН ґрунту для розчинення поживних речовин та перетворення їх в засвоювані форми; хелатувати токсичні сполуки; залучати корисну мікробіоту або виділяти токсичні речовини для патогенів тощо [35, 104, 194, 248, 264]

Кількість речовин, які екскретуються в середовище, залежить від виду рослин, кліматичних умов, складу ґрунтів та інших факторів. Однак найважливішим фактором екскреторної активності кореня є механізми екскреції [100, 122, 140].

Зараз можна виділити два основні механізми кореневої екскреції: пасивний і активний транспорт виділення речовин [34, 77].

Вважається, що екскреція ексудату коренем за допомогою пасивного транспорту відбувається завдяки: транспорту речовин через мембрану кореня за допомогою дифузії, через іонні канали та транспорт везикул [164, 230, 265].

Активний транспорт речовин відбувається за допомогою білків, розташованих в кореневій плазматичній мембрані [269, 272].

**Дифузія.** В процесі дифузії через плазматичну мембрану корневих клітин виділяються молекули та речовини з низькою молекулярною масою (амінокислоти, цукри, карбонові кислоти та ін.). Як відомо, механізм дифузії залежить від градієнта концентрації сполук, які екскретуються, між цитоплазмою клітин кореня та їх концентрацією в ризосфері. Процес дифузії залежить від проникності кореневої мембрани, її цілісності та від полярності сполук, які виділяються [30, 59, 73, 265] (Рис. 1.2). Наприклад, при цитозольному рН = 7,1-7,4 низькомолекулярні сполуки (амінокислоти та карбонові кислоти, які знаходяться у вигляді аніонів) характеризуються низькою проникністю для плазмалемми, а іони  $K^+$  мають високий дифузійний потенціал. Слід зазначити, що екскреція амінокислот та цукрів, яка відбувається за допомогою дифузії, може посилюватися при стресі, бо такі фактори як екстремальна температура, окислювальний стрес та інші впливають на цілісність мембрани [43].

**Іонні канали.** Деякі хімічні речовини, такі як специфічні карбоксилати, не можуть дифундувати крізь кореневі мембрани. Транспорт деяких високомолекулярних сполук відбувається крізь іонні канали клітини кореня рослин за допомогою різних транспортних білків, пов'язаних з мембраною клітин кореня [117, 191, 193, 195]. Селективні іонні канали – інтегральні білкові комплекси мембран, що утворюють гідрофільну пору. Основною складовою рушійної сили цього транспорту є градієнт електрохімічного потенціалу іона [108, 267].

Іонні канали відповідальні за секрецію вуглеводів та карбоксилатів, таких як малат і оксалат, які виділяються коренем у великій кількості [6, 158, 174]. Вони не можуть транспортуватися крізь мембрану в процесі дифузії, їх виділення відбувається за допомогою білків. Серед білків-транспортів найбільш вивченими є транспортери, які активовані алюмінієм та малатом (aluminum-activated-malate transporters ALMT). Ці переносники складаються з декількох білків, які беруть участь у різних фізіологічних процесах, наприклад, в виділення органічних кислот (малат), у присутності  $Al^{3+}$  у ґрунті.

Певні дослідження показали існування двох іонних каналів: повільні іонні канали (SLAC- slow anion channels), S-тип – канали), для активації яких потрібно кілька секунд, та швидкі іонні канали (QUAC- quick anion channels), R-тип – канали), для активації яких потрібно всього кілька мілісекунд [73, 204, 220, 237, 273].

**Транспорт везикул.** Цей процес перенесення речовин включає транспортування високомолекулярних сполук, таких як полісахариди, які вивільняються з клітин кореневого ковпачка та опосередковуються бульбашками Гольджі. Секреторні клітини дегенерируют та злищуються. Секреторні білки, такі як ектоензими (фосфатаза, фітаза, пероксидаза), синтезуються мембранозв'язаними полісомами та потрапляють у просвіт ендоплазматичного ретикулуму. Проходять крізь апарат Гольджі, вони переносяться до плазматичної мембрани за допомогою переносних везикул, і

їх злиття з мембраною залежить від рівня позаклітинного і внутрішньоклітинного кальцію. Цей процес перенесення речовин ще називають екзоцитозом. Везикули перенесення також беруть участь у зберіганні та вивільненні таких низькомолекулярних сполук, як фенольні та фітосідерофори [37, 264, 268, 269].

Везикули також беруть участь у захисті клітин від токсичних сполук, наприклад, токсичних флавоноїдів. Везикули накопичують ці речовини, а потім виділяють їх з клітки [73, 264].

Хімічні речовини, що містяться в корневих екsudатах, при виділенні їх у великій кількості в ризосферу піддаються фізичним (сорбція), хімічним (окислення металу) та біологічним (мікробна деградація) перетворенням у ґрунті [43].

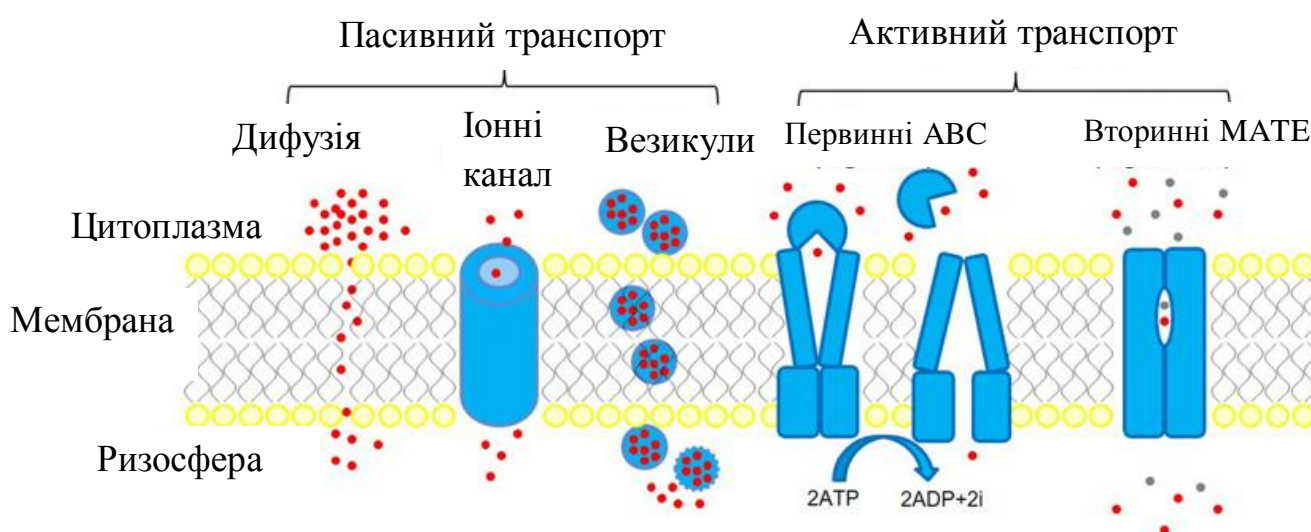


Рис. 1.2 Механізми кореневої секреції. Червоні кола - молекули, що виділяються в ризосферу [264]

**Активний транспорт речовин.** Цей вид транспорту здійснюється за допомогою білків, розташованих у плазматичній мембрані. Серед них виділяють два види білкових переносників: ABC (“ATP-binding cassette transporters”) та MATE (“Multidrug and toxic compound extrusion”) [29, 38, 145, 241].

Переносники ABC (АТФ-зв'язуючі касетні транспортери) для роботи використовують енергію при гідролізі АТФ. Робота носіїв MATE базується на градієнті  $H^+$  [136, 145, 241, 269].

Носії ABC є широко поширене сімейство білків, виявлених у різних видів організмів. Так, їх кількість у рослині *Arabidopsis* перевищує кількість, яка виявлена у людей. Носії ABC у бактеріях беруть участь в експорті та імпорті сполук у клітину та з неї. Крім цього, ці носії беруть участь у виділенні токсичних сполук, транспортуванні поживних речовин і перенесенні іонів важких металів. [46, 133, 143, 144, 201, 217].

Друга група носіїв MATE також бере участь у процесах кореневої секреції. Вони були виявлені у рослин *Arabidopsis*, ячменю і рису. Вони є активними носіями, які сприяють виділенню лужних та цитрат іонів, беруть участь у транспорті антибіотиків та фенольних сполук. Ці носії використовують електрохімічний градієнт інших іонів при транспортуванні речовин крізь мембрану [84, 231, 264, 275].

Були також виявлені носії, звані ALMT (aluminum-activated malate transporter). Це складні білки, які беруть участь у різних фізіологічних та біологічних процесах. Наприклад, у секреції органічних кислот, особливо малата, у присутності токсичного іона алюмінію  $Al^{3+}$  у ґрунті. Це сімейство носіїв активується в умовах алюмінієвого стресу. Слід зазначити, іони алюмінію активують групу носіїв MATE, які в свою чергу беруть участь у виділенні цитрату. Слід зазначити, що носії ALMT беруть участь у секреції малата в умовах дефіциту фосфору [84, 157, 201, 244].

Коріння рослин виділяють у середовище низькомолекулярні хелатуючі речовини - фітосідерофори, які утворюють комплекси з  $Fe^{3+}$ . У транспорті металів беруть участь так звані MFS білки (the major facilitator superfamily transporters). Ці білки можуть функціонувати як носії - уніпортер (полегшена дифузія) та антіпортер (обмінник, активний транспорт). Наприклад, деякі учасники цього сімейства білків беруть участь у виділенні дезоксимуґінової й авенової кислот з коренів залізодефіцитних рослин рису [151, 217, 228].

Існують і інші носії, виявлені в рослинах, які беруть участь у підтримці іонного балансу, зменшуючи концентрацію вільних іонів металів у коренях (Fe, Zn, Mn, Cu). Інші носії, такі як монополісахаридні носії, переносять гексози і петози [30, 73, 80].

Після того, як первинні та вторинні метаболіти вийшли крізь плазматичну мембрану в міжклітинний простір за допомогою вищевказаних механізмів, вони можуть виділятися у середовище за допомогою апопластичного транспорту. Вони можуть виділятися шляхом дифузії без будь-яких перешкод, особливо в кінці кореня. Слід зазначити, що в зоні диференціювання або ентодерми, клітини яких утворюють область, так звану смугу Каспера, блокується апопластичний транспорт. Це було виявлено при вивченні вмісту кореневих екзометаболітів у зоні апопласта на кінці кореня рослини *Arabidopsis* та у зоні ризосфери [73, 144, 157, 228].

#### **1. 4 Характеристика ризосфери кореня**

Як відомо, кореневі екзометаболіти формують ризосферу кореня. Вперше цей термін ввів німецький вчений у галузі сільського господарства та фізіології рослин - Lorenz Hiltner. Hiltner L. описав ризосферу, як область навколо кореня рослини, в якій мешкає цілий ряд організмів, таких як хробаки, гриби, бактерії та інші, уражені виділеннями коренів, які виділяються з коріння цих рослин та модифікуються мікробами [42, 121, 172, 183, 194, 211]. Наявність мікроорганізмів та корневих екзометаболітів у ризосфері забезпечує складні взаємодії між різними типами організмів, наприклад, симбіотичні, паразитичні, конкуруючі та інші [104, 124, 195, 238, 277].

Зараз «ризосфера» - (від грец. *rhiza* - корінь і *sphaira* - куля, сфера) – це вузька зона, яка оточує та знаходиться під впливом коренів рослин (товщиною близько 2-5 мм), в якій знаходиться основна кількість



мікроорганізмів, та вважається однією з найскладніших екосистем на Землі [26, 55, 86, 162, 173, 175].

У ризосфері виділяють три області залежно від їх розташування біля кореня [259].

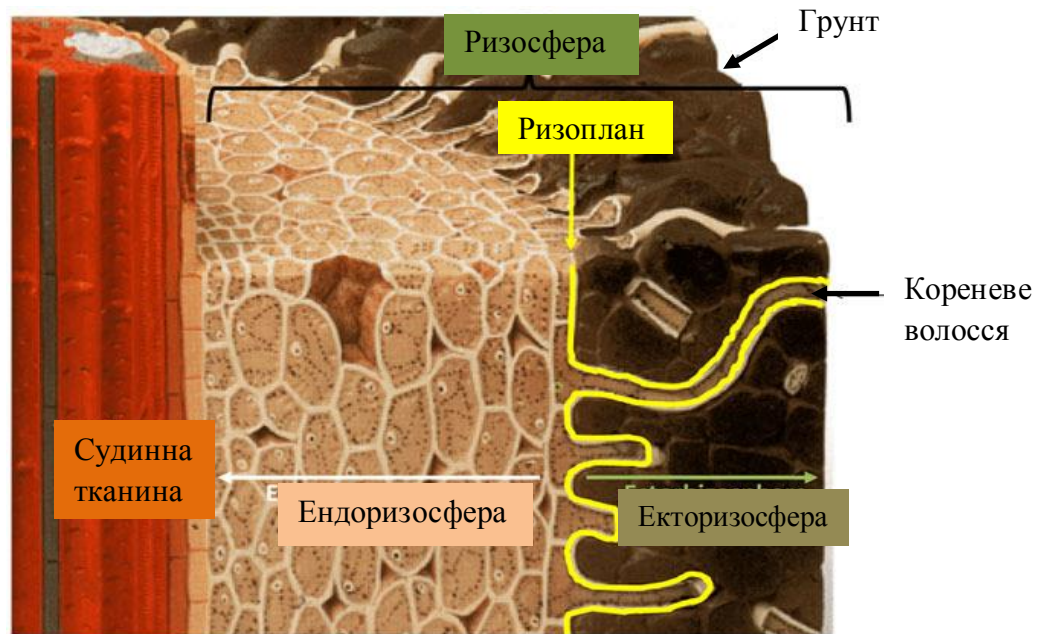


Рис. 1.3 Схема, яка демонструє структуру ризосфери та кореня [172]

Ендоризосферна зона включає до себе частини тканини кореня (внутрішній епідерміс та кортикальні шари). Це область кореневої кори, яку деякі мікроби можуть займати у вільному просторі між клітинами. Ризоплан – це медійна область, яка безпосередньо прилягає до кореня, та включає кореневий епідерміс та слизь [172, 211]. Третя область (екторизосфера) включає в себе ґрунт біля кореня. Ці області можуть змінюватися в своєму просторі в залежності від росту коренів рослин, оскільки коріння рослин характеризуються тим, що вони не мають певного розміру та форми [85, 87, 135, 259, 274].

## 1. 5 Мікроорганізми ризосфери

Кореневі екзометаболіти, до складу яких входять цукри, білки, амінокислоти та інші сполуки, є субстратами для мікроорганізмів або, іншими словами, навколо кореня формується специфічне біологічно активне середовище. У цьому середовищі активно розмножуються мікроорганізми, що веде до колонізації ризосфери. У ризосфері коренів виявляють бактерії різних видів (PGPR- Plant growth-promoting rhizobacteria) та гриби (мікоризи) [40, 87, 102, 175, 214].

Бактерії, які знаходяться біля кореня, належать до різних родів, таких як: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Cellulomonas*, *Flavigena*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Methylobacterium*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus*, та *Azoarcus* [111, 186, 264]. Було виявлено позитивний вплив цих видів бактерій на рослини при колонізації коренів [28].

Існують азотфіксуючі бактерії, які є ендofітами та належать до сімейства *Rhizobiaceae*, які колонізують коріння бобових рослин та утворюють бульби. Приклади цих типів: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* та *Rhizobium*. Існує інша бактеріальна група, яка була виявлена в коренях рослин, вона відноситься до *Rhizobiaceae*: *Actinomycete*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Thermobifida* і *Micromonospora*. Було показано, що ці види бактерій стимулюють ріст рослин та підвищують стійкість рослин до грибкових патогенів [12, 29, 87, 102, 123].

Бактерії ризосфери виконують різні функції:

1 - вони сприяють засвоєнню поживних речовин рослинами. Це забезпечується тим, що мікроорганізми гідролізують органічні залишки, які можуть засвоюватися кореневою системою, сприяють іонізації солей, змінюють фізико-хімічні характеристики в ризосфері. Все це може

призводити до збільшення стійкості рослин до засолення і зниження ступеня стресу від дегідратації, що, в свою чергу, сприяє росту і розвитку коренів [70, 87, 123].

2 - виділяють фітогормони та інші біологічно активні сполуки, які стимулюють ріст коренів; виділяють антибіотики, які пригнічують ріст патогенних для рослин мікроорганізмів [127].

3 - регулюють кореневу екскерцію коренів рослин.

4 - сприяють формуванню специфічних рослинних угруповань [21].

Бактерії в ризосфері потрапляють з поверхні насіння. У ризосфері вони активно ростуть та розмножуються і цей процес називається колонізацією кореня. Бактерії можуть перебувати на поверхнях насіння або коренів, їх називають епіфітами, якщо ж бактерії проникають у корінь та ростуть всередині, то їх називають ендofітами [190, 195, 222].

Колонізація рослин бактеріями, особливо в кореневій зоні, є необхідним фактором для рослини, бо вона сприяє формуванню кореневої системи [22, 260].

З іншого боку, кореневі екsudати в ризосфері збільшують кількість бактерій. Було показано, що додавання деяких хімічних речовин, отриманих з корневих екsudатів, збільшує вміст мікроорганізмів у ґрунті, що оточує корінь [15, 75, 190, 203]. Мікроорганізми, в свою чергу, грають важливу роль у швидкості росту рослин та підвищують його стійкість до біотичного та абіотичного стресів [15, 127, 196, 203, 233].

Також, секретуючи кореневі виділення, рослини можуть змінювати рН ґрунту, що призводить до пригнічення корисних бактерій, грибів та навіть нематод [149]. Badri D. та інші відзначили, що бактеріальні групи мають різну чутливість до фенольних сполук, які присутні в екзометаболітах коренів *A. thaliana*, оскільки вони стимулювали ріст однієї групи бактерій та пригнічували ріст іншої групи бактерій [28].

В інших дослідженнях описано позитивний вплив сполук секреції коренів цитрусових рослин на бактерії-ризобактерії, *Pseudomonas putida*,

*Novosphingobium sp.* [264]. Іноді, у результаті адаптації рослин до несприятливих факторів середовища відбувається зміна складу корневих екзометаболітів, що, в свою чергу, робить позитивний вплив на мікроорганізми, що знаходяться навколо кореня. Наприклад, коли рослина піддається тепловому стресу або засоленню (цитрусова сіль), корінь підсилює секрецію проліна, який може використовуватися ризобактеріями як джерело поживних речовин [24, 75, 264].

Мікоризи. В залежності від регіону, в якому присутні ці гриби, їх поділяють на три групи. Перша група – це AMF (mycorrhizal arbuscular fungi), арбускулярні гриби мікоризи, які називають ендомікоризами. Ці гриби здатні проникати в кірку кореня. Друга група – це VAM (vesicular arbuscular mycorrhiza) везикулярна арбускулярна мікориза [225]. Третя група – це ЕСМ (ectomycorrhizal), ектомікоризні гриби цієї групи живуть поза поверхнею кореня, але в деяких випадках було відмічено, що волокна грибів проникають в клітини рослини. Більшість грибів, яка належить до цих груп, належить до наступних рас: *Glomeromycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* та *Zygomycota* [91, 183, 214].

AMF гриби є найбільш поширеними мікробними спільнотами, які були виявлені в багатьох сортах рослин, включаючи сільськогосподарські культури, овочі, трави, дерева. Ці гриби регулюють склад речовин в ґрунті, які впливають на ріст рослини та засвоєння мінералів [153]. Хімічні речовини, які отримані з корневих виділень, є основним сигналом між коренем і цими мікробами [178, 195, 246].

Була виявлена різниця між колонізованими цими грибами рослинами та неколонізованими рослинами. Було показано, що гриби призводять до зміни якості дихання кореня, збільшують швидкість екскреції корневих екзометаболітів та впливають на їх склад. Також гриби грають важливу роль у низькій захворюваності рослин. Це відбувається через складну взаємодію між патогенами та грибами рослин AMF [91, 183, 214].

Мікоризи в коренях впливають на: регулюють експресію генів, що кодують білки, а саме транспортні білки для фосфату та амонію; сприяють поліпшенню азотного і фосфорного харчування; беруть участь у процесах адаптації рослин до сольового стресу; можуть збільшити швидкість фотосинтезу; беруть участь у регуляції антиоксидантної системи та ін. [156, 256, 261].

Таким чином, навколо кореня формується біологічно активна саморегулююча система за рахунок виділення корневих екзометаболітів та життєдіяльності мікроорганізмів в ризосфері.

## **1. 6 Вплив передпосівної обробки на проростання насіння та ріст рослин**

Колонізація рослин бактеріями, особливо в кореневій зоні, є необхідним фактором для формування кореня, проростання рослини та взаємодії кореня з навколишнім середовищем [13, 23, 132].

Відомо, що спори бактерій знаходяться на поверхні насіння: епіфіти – бактерії, які знаходяться на поверхні шкірки насіння та ендofіти – бактерії, які знаходяться всередині насіння [132, 195, 222]. При проростанні насіння ці бактерії, в першу чергу, формують середовище для росту кореня, потім мікроорганізми активно ростуть та розмножуються в ризосфері [149, 188, 236].

Умови зберігання насіння може впливати на кількісний і якісний склад бактерій на поверхні насіння, що в подальшому впливає на проростання насіння, швидкість росту кореня та рослини, а також на екскрецію та склад корневих екзометаболітів [192].

Дослідження в області сільськогосподарської біотехнології спрямовані на пошук методів або способів передпосівної обробки насіння, які допоможуть поліпшити схожість та ріст насіння, підвищать їх стійкість до

абіотичних стресів та факторів навколишнього середовища, що, в свою чергу, приведе до збільшення виробництва сільськогосподарських культур [2, 163].

Існують різні методи передпосівної обробки насіння, серед яких є фізичні методи (температура, ультрафіолетове випромінювання, магнітне поле) [18, 207].

Хімічні методи включають обробку насіння різними хімічними розчинами, такими як перекис водню, мелатонін, гідроксид натрію, перманганат калію та інші хімічні сполуки [21, 47].

Крім того, існують біологічні способи передпосівної обробки, а саме використання корисних мікроорганізмів в якості альтернативи хімічним пестицидам та синтетичним добривам в сільськогосподарському виробництві. Застосування корисних для насіння мікроорганізмів є ефективним способом для проростання насіння. Так, мікроорганізми-інокулянти потрапляючи в ґрунт колонізують коріння розсади та захищають їх від хвороб і шкідників, що знаходяться в ґрунті. Однак, незважаючи на інокуляцію насіння бобових *Rhizobia spp.* і отримані позитивні результати в лабораторних умовах відносно того, що широкий спектр корисних мікроорганізмів покращує продуктивність сільськогосподарських культур, все ще є дуже мало комерційно доступних препаратів-мікроорганізмів для обробки насіння [16, 192, 219].

Методи інокуляції насіння, що використовуються в дослідницьких цілях, часто не здійсненні в комерційному масштабі бо існують значні технічні проблеми у підтримці життєздатних мікробних інокулятів на поверхні насіння в ході комерційних процесів обробки та зберігання насіння. Розробка нових складів мікрорганізмів-інокулянтів дозволить використовувати їх не тільки у сільському господарстві, а й для відновлення екосистем та біоремедіації [36, 192, 219].

Дослідження, в яких використовували методи передпосівної обробки показали, що обробка насіння формує таке фізіологічне становище, яке дозволяє насінню проростати більш ефективно, та вони стають більш

стійкими до абіотичних стресів [131, 163]. Крім того, коріння таких проростків стають більш твердими в ґрунті та більш розгалуженими, що дозволяє їм стабілізуватися в ґрунті та збільшити площі поверхні кореня, що, в свою чергу, підвищує швидкість поглинання мінералів, присутніх у ґрунті. Також збільшується стійкість рослин до патогенних мікроорганізмів, що оточує корінь [19, 47, 79, 129].

Таким чином, передпосівна обробка насіння дозволить поліпшити якість врожаю та обсяг сільськогосподарського виробництва, що є метою сільськогосподарської біотехнології [2].

### **1.7 Роль гормезиса при формуванні відповідної реакції рослин на дію стрес-факторів**

Гормезис - це термін, який використовується для позначення реакції біологічної системи на стрес-фактор навколишнього середовища в залежності від дози. Помірні дози стрес-фактора мають стимулюючий вплив на біологічну систему. При збільшенні доз стрес-факторів відбувається інгібування функціонального стану біологічної системи [9, 10, 71, 88, 159, 171]. Наприклад, радіаційний гормезис має позитивний вплив, тобто малі дози опромінення позитивно впливають на біологічні системи. Формування гормезису було виявлено у рослин, тварин і у мікроорганізмів. [54, 60, 61, 110, 159].

Фактори, які впливають на формування гормезису в біологічних системах поділяють на фізичні, біологічні та хімічні. Наприклад, фізичні фактори це випромінювання, температурний шок, тепловий або холодний та інші [8, 39, 61].

Реакція організму або клітини на низьку дозу використаного токсину або фактора навколишнього середовища є адаптивним компенсаторним процесом, але після виникнення первинного дисбалансу. Було показано, що попередня адаптація біологічної системи до дії низьких, а потім поступово

збільшених (або таких самих) доз стрес-фактора, приводила до стійкості біологічної системи до доз, які спочатку були для системи летальними [53, 54]. У той же час, формування гормезису залежить не тільки від дози стрес-фактора, а й частоти та кількості введень стрес-фактора у біологічну систему [62, 88, 242].

Farooq N. та інші показали, що гормезис грає важливу роль у розвитку стійкості рослин до деяких пестицидів. Було показано, що в процесі формування гормезису в клітинах індукується синтез спеціальних білків, наприклад, таких як фактори росту [89, 171, 276].

Німецький фармаколог Hugo Schulz описав феномен гормезису в 1888 році, коли стимулював ріст дріжджів дуже низькими дозами токсинів. Німецький лікар Рудольф Арнольт також спостерігав формування гормезису у тварин у разі використання низьких доз ліків. Однак, використання терміну «гормезис» у наукових дослідженнях вперше було введено Chester Southam і John Ehrlich в 1943 році [130, 257].

Було показано, що формування гормезису може відбуватися у всіх типів клітин тваринного та рослинного походження, а також на рівні організму. Було виявлено, що формування гормезису супроводжувалося стимуляцією росту клітин, збільшенням стійкості організму, тривалістю життя, змінами метаболізму та ін. [53, 67, 72].

У XIX столітті світло було використане в якості першого фізичного агента, який стимулював ріст рослин. Світло не розглядали як токсичний або мутантний фактор. Пізніше були виявлені негативні ефекти світла на рослини, особливо при високих його рівнях [137, 208, 224]. Потім досліджували вплив рентгенівських променів на різні організми як чинника, що приводить до формування гормезису [65]. В якості хімічних речовин, які формують гормезис, в XIX столітті Reviel P. O. використовував низькі та високі дози гіпохлориду натрію для стимуляції проростання насіння [97].

Було показано, що при формуванні гормезису у рослин, відповідь рослин варіювала та залежала від діючого фактора [9, 10, 56].



Дослідження показують, що застосування фізичних, хімічних або біологічних факторів, які приводять до формування гормезису, може привести до підвищення продуктивності рослин та підвищенню стійкості рослин до впливу навколишнього середовища. Вплив низькодозового стресу, який також приводить до формування гормезису, можна використовувати в якості біологічного захисту рослини від подальшого впливу того ж фактора або різних інших [7, 64].

Зараз широко використовують різні хімічні сполуки, такі як перекис водню, мелатонін, гідрохлорид натрію, поліамінів та інші для обробки насіння для їх кращого проростання, використовують фунгіциди, стробілурини, беноміли, які захищають рослини від зараження. Всі ці речовини використовують для обробки насіння та рослин. Така обробка довела свою ефективність у захисті рослин від негативних факторів навколишнього середовища, тому вона вважається важливим засобом підвищення витривалості рослин. Також ця обробка може стимулювати ріст рослин, збільшувати продуктивність рослин і опірність рослин до патогенних мікроорганізмів. Механізми дії такої обробки схожі з механізмами гормезису, тому таку обробку вважають одним із проявів гормезису [11, 24, 63, 70].

Отже, будь-який фізичний, хімічний чи біологічний агент (біостимулятор) можна використовувати в якості каталізатора або регулятора діяльності рослин, але слід враховувати дозу фактора та мікробіологічний склад ризосфери кореня, які можуть стимулюватися або інактивуватися тією ж дозою фактора, яка приводить до формування гормезису у рослин [11, 71]. Таким чином, можна сказати, що гормезис грає важливу роль у розвитку рослинництва та сільському господарстві, а вивчення та розуміння механізмів гормезису на клітинному та молекулярному рівнях дозволить розробити сучасні методи в галузі біотехнології, які дозволять отримувати продукти в необхідній кількості та необхідної якості [47, 171].

## Висновки до розділу 1

Корінь має розвинену систему екскреції різних метаболітів. Від 30 % до 60 % синтезованих у процесі життєдіяльності рослин речовин екскретуються у навколишнє середовище. Серед корневих екзометаболітів є велика кількість біологічно активних сполук: амінокислоти, ферменти, сахара, вітаміни, фітогормони та ін. Інтенсивність екскреції залежить від виду рослин і стадії онтогенезу. На інтенсивність екскреції впливають різні чинники як фізичної так і біологічної природи. Особливу роль у функціонуванні екскреторної системи кореня виконують ризосферні мікроорганізми. Знання механізмів регуляції кореневої екскреції є основою корневих біотехнологій, які спрямовані на отримання біологічно активних сполук. Разом з тим, зараз залишається мало вивченим вплив різних способів передпосівної обробки насіння на ризосферні мікроорганізми і на кількісні та якісні характеристики корневих метаболітів, які екскретує корінь. Цьому присвячено наше дослідження.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [22, 27, 47, 142, 147].

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ І МАТЕРІАЛИ

#### 2. 1 Об'єкти дослідження

У роботі використовували насіння гороху (*Pisum sativum*) та насіння пшениці (*Triticum aestivum*) врожаю 2018 року. Насіння пшениці та гороху обробляли трьома способами.

#### 2. 2 Способи передпосівної обробки насіння

*Контрольний варіант:* зерна пшениці та гороху 3 рази промивали проточною водою та 3 рази дистильованою стерильною водою.

*Перший спосіб передпосівної обробки:* зерна пшениці та гороху після промивання, як описано в контрольному варіанті замочували в 0,05 % розчині перманганату калію на 5 хвилин, потім багаторазово (3-4 рази) промивали дистильованою стерильною водою.

*Другий спосіб передпосівної обробки:* після контрольного промивання зерна пшениці та гороху замочували на 30 секунд у 70 % етиловому спирті ( $C_2H_5OH$ ), потім промивали стерильною дистильованою водою і потім замочували на 30 хвилин в 5 % гіпохлорит натрію ( $NaOCl$ ). Після цього зерна промивали стерильною дистильованою водою

*Третій спосіб передпосівної обробки* насіння відрізнявся від другого способу часом замочування зерен в етиловому спирті та гіпохлорит натрію. Тобто, після контрольного промивання зерна пшениці та гороху замочували на 5 хвилин у 70 % етиловому спирті ( $C_2H_5OH$ ), потім промивали стерильною дистильованою водою і потім замочували на 40 хвилин у 5 % гіпохлорит натрію ( $NaOCl$ ). Після цього зерна промивали стерильною дистильованою водою (Рис. 2.1).



На першу, другу та третю добу росту збирали кореневі екзометаболіти (КЕМ) і проводили їх аналіз.

### **2. 3 Визначення схожості насіння та швидкості росту проростків коренів**

Для визначення схожості насіння пшениці та гороху на 1, 2 та 3 добу росту рахували кількість зерен, які не проросли.

Визначали довжину коренів з 1 по 3 добу росту. Для визначення швидкості росту коренів розраховували питому швидкість росту і висловлювали в см / добу.

### **2. 4 Збір та характеристика корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху**

Збір корневих екзометаболітів проводили в проточному режимі. Для цього через 24 години після того як проклінулися зернівки розклали в чашки Петрі, додали дистильовану воду в стерильних умовах, збирали водний розчин корневих екзометаболітів - це водний розчин корневих екзометаболітів 1-добових проростків коріння. Потім до проростків в чашки Петрі знову вносили по 7 мл та 10 мл дистильованої стерильної води для пшениці та гороху, відповідно. Культивували зерна в тих же умовах і через 24 години збирали водний розчин корневих екзометаболітів - це 2-добові кореневі екзометаболіти. Аналогічно збирали 3-добові кореневі екзометаболіти [147].

Для характеристики 1, 2 та 3 добових корневих екзометаболітів визначали вміст загального білка, вільних амінокислот та загальних вуглеводів.

#### **2. 4. 1 Визначення вмісту загального білка**

Визначення загального білка у водних розчинах корневих екзометаболітів проводили за методом Лоурі [161]. До 1 мл водних екзометаболітів додавали 1 мл 2N NaOH. Потім додавали 2 мл реактиву С (2 % розчин  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , цитрат натрію та  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), через 10 хвилин додавали 200 мл реактиву Фолина (представляє собою розчин суміші вольфрамату натрію, ортофосфорної кислоти та  $\text{MoO}_3$ , який в присутності фенолів забарвлюється. Через 30 хвилин визначали екстинкцію при довжині хвилі 650 нм на спектрофотометрі Shimadzu UV-2600 (Японія).

#### **2. 4. 2 Визначення вмісту загальних вуглеводів**

Вміст вуглеводів у складі корневих екзометаболітів визначали за методом Моліша [170]. Для цього до водних аліквот корневих екзометаболітів додавали 0,5 мл 5 % водного фенольного реактиву. Проби інтенсивно перемішували і вносили до них по 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти (61 %). Через 20 хвилин визначали екстинкцію при довжині хвилі 488 нм на Shimadzu UV-2600 (Японія). Вміст загальних вуглеводів визначали за калібрувальної кривої для глюкози та висловлювали у мкг глюкози / 100 зерен.

#### **2. 4. 3 Визначення вмісту амінокислот**

Визначення вмісту амінокислот в водневих розчинах екзометаболітів проводили нінгідриним методом як описано в [50]. Для цього до аліквоти корневих екзометаболітів додавали рівний об'єм 10 % трихлороцтової кислоти та інкубували зразки 12 годин при  $+4^\circ\text{C}$  для того, щоб осіли білки. Після цього проби центрифугували при 3000 g протягом 20 хвилин. З надосадової рідини відбирали аліквоти, доводили їх дистильованою водою до

0,6 мл і додавали 1 мл 1 % нингідрину і 1 мл 10 % піридину. Після цього проби інкубували на водяній бані протягом 30-40 хвилин при 100 °С. Після охолодження проб визначали екстинкцію при довжині хвилі 570 нм на Shimadzu UV-2600 (Японія). Вміст амінокислот визначали за калібрувальної кривої для гліцину та висловлювали в мкг гліцину / 100 зерен.

#### **2. 4. 4 Збір та визначення кількості прикордонних клітин кореня**

Для препаративної ізоляції прикордонних клітин 0,5 мл дистильованої води додавали у відсік пластикового культурального планшета, закріпленого на магнітній мішалці. Апікальну кореневу зону завдовжки 1,5-2 см (без відділення кореня від каріопсису) занурювали до води, яка постійно перемішувалася, на 1-2 хвилини, щоб видалити гелеву оболонку апекса з прикордонними клітинами. В одному відділенні культурального планшета обробляли 10 коренів пшениці та гороху. Середовище, в якому містилися прикордонні клітини, переносили з відсіку для планшетів в пробірки і центрифугували при 3000 g протягом 15 хвилин для осадження прикордонних клітин. Осад, що містив прикордонні клітини, фіксували 2 % глутаровим альдегідом та фарбували 0,06 % трипановим синім. Кількість прикордонних клітин, виділених препаративним методом, підраховували в камері Горяєва і розраховували, як кількість клітин на корінь.

#### **2. 5 Культивування корневих екзометаболітів на універсальному живильному середовищі**

Для аналізу обсіменіння корневих екзометаболітів (КЕМ), водні КЕМ проростків пшениці та гороху висаджували на агаризоване поживне середовище м'ясо-пептонний агар – МПА.

2-добові екзометаболіти проростків пшениці наносили на живильне середовище у стерильних умовах мікропіпеткою по 3 мкл. Зразки культивували в термостаті при 37 °С протягом 24 годин [23].

Динаміку росту мікроорганізмів 2-добових КЕМ на МПА оцінювали за площею колоній. Для цього через кожні 3 години фотографували колонії і за допомогою комп'ютерної програми Axio vision визначали площу колоній, яку висловлювали в умовних одиницях.

## 2. 6 Визначення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху після різних способів передпосівної обробки

Визначення епіфітних мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху проводили після контрольного варіанту передпосівної обробки, після 1-го та 2-го способів. Після передпосівної обробки з поверхні насіння пшениці та гороху брали мазки (Рис. 2.2) [21, 22].

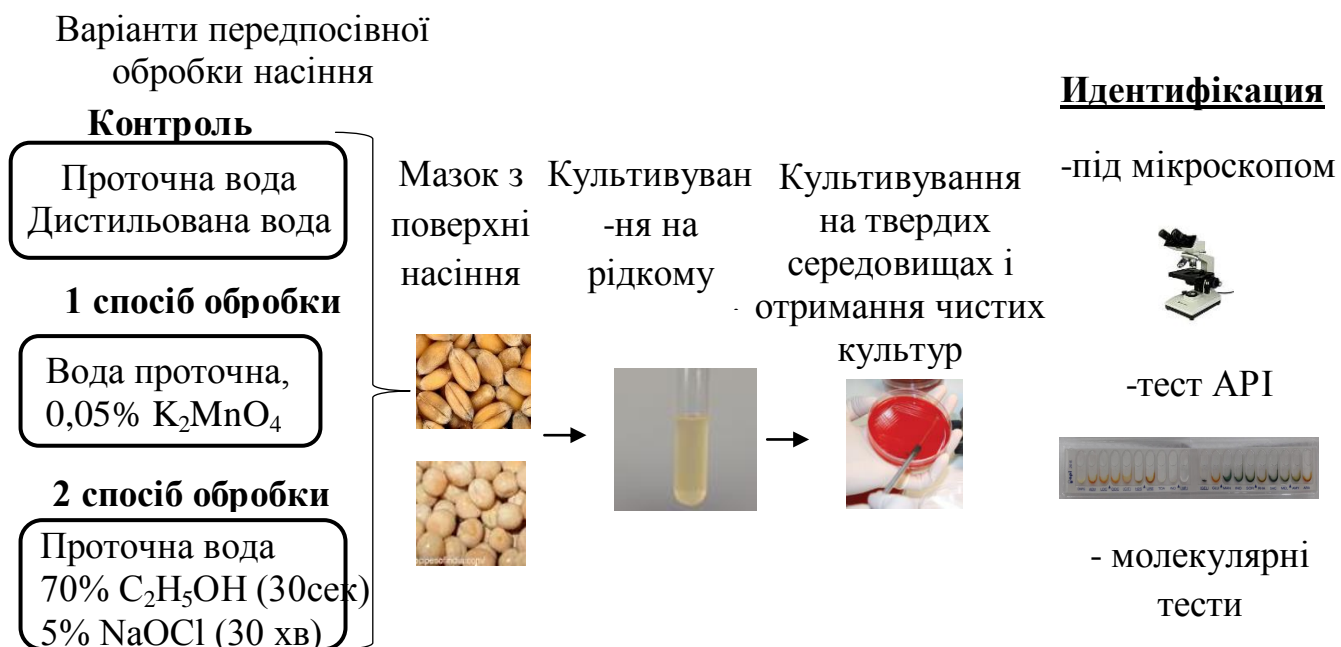


Рис. 2.2 Схема експерименту, яка демонструє варіанти передпосівної обробки насіння, забір зразків з поверхні насіння і подальше культивування мікроорганізмів на різних поживних середовищах



### **2. 6. 1 Культивування мікроорганізмів-епіфітів пшениці та гороху на твердих поживних середовищах**

Зразки мікроорганізмів культивували на універсальному рідкому поживному середовищі (м'ясо-пептонний бульйон) при 37 °C протягом 24 годин. Після початку активного росту бактеріальних культур зразки переносили на тверді поживні середовища для отримання чистих культур мікроорганізмів.

В роботі готували три варіанти твердих поживних середовищ: м'ясо-пептонний агар (МПА), насичене середовище (кров'яний агар) та селективне середовище (MacConkey агар) – диференціальне середовище для грамнегативних і грампозитивних бактерій.

З рідкої культури мікроорганізмів петлею відбирали і наносили зразки на приготовані тверді поживні середовища. Зразки мікроорганізмів культивували 24 години при 37 °C. У чашках Петрі спостерігали ріст різних колоній, які відрізнялися за формою, кольором та розміром. Далі отримували чисті культури бактерій за допомогою методу streak plate.

### **2. 6. 2 Визначення морфології клітин бактерій**

Для визначення морфології клітин бактерій зразки отриманих колоній фарбували за Грамом [103] і вивчали їх форму, колір та рух клітин під мікроскопом.

### **2. 6. 3 Ідентифікація бактерій за індексом аналітичного профілю (API) 20E**

Для ідентифікації грамнегативних бактерій визначали біохімічні показники клітин за допомогою API 20E-тесту. API-тест використовують для визначення роду грамнегативних бактерій родини ентеробактерій

(*Enterobacteriaceae*). У роботі використовували набір компанії BioMerieux (Франція), який представлено набором ферментативних реакції з 20 хімічних тестів. Кожен тест (API-пластинка) являє собою мікропробірку, яка містить необхідні компоненти для хімічних реакцій (Рис. 2.3, Табл. 2.1).



Рис. 2.3 Контрольна пластинка для тесту API для ферментативних реакцій

У стерильну пробірку з 5 мл фізіологічного розчину 0,9 % NaCl додавали колонії досліджуваних бактерій і перемішували їх. Отриману суспензію вносили до мікропробірки тест-пластинки і покривали маслом ODH, LDH і ADH. Пластинки з бактеріями інкубували в стандартних умовах. Протягом інкубаційного періоду відбувалися ферментативні реакції, в результаті чого змінювався колір розчинів (Рис. 2.3).

Таблиця 2.1

**Варіанти тестування, що дають утворення продуктів ферментативної реакції та скорочені назви**

Номер реакції	Назва тестів	Тип реакції / ферменти	<i>P. agglomerans</i>	<i>P. fluorescens</i> or <i>P. putida</i>	<i>K. pneumoniae</i> or <i>R. terrigena</i>
1	ONPG	Виробництво Бета-галактозидаза	+	-	+
2	ADN	Аргініндигідролаза	-	-	-
3	LDC	Лізин-декарбоксилаза	-	-	+

Продовження таблиці 2.1

4	<u>ODC</u>	Орнітиндекарбоксилаза	-	-	-
5	<u>CIT</u>	Утилізація цитрату	-	+	+
6	H <sub>2</sub> S	Виробництво H <sub>2</sub> S	-	-	-
7	URE	Уреаза	-	-	-
8	<u>TDA</u>	Триптофан дезаміназа	+	-	-
9	IND	Індолеве виробництво	-	-	-
10	<u>VP</u>	Виробництво ацетоїну	+	-	+
11	<u>GEL</u>	Желатиназа	+	-	-
12	GLU	Ферментаційна глюкоза	+	+	+
13	MAN	Фер. Манітол	+	-	+
14	INO	Фер. Інозитол	-	-	+
15	SOR	Фер. сорбитол	-	-	+
16	RHA	Фер. Рамноз	+	-	+
17	SAC	Фер. Сахароза	+	-	+
18	MEL	Фер. Мелібіоза	+	+	+
19	AMY	Фер. Амігдалін	+	-	+
20	ARA	Фер. Арабіноза	+	-	+

За результатами тесту (семізначна формула) визначали рід бактерій за допомогою стандартної таблиці (Табл. 2.1) або каталогу, що додається до тестів [270].

#### 2. 6. 4 Молекулярні тести

Для визначення роду, видів і штамів бактерій з отриманих колоній чистих культур мікроорганізмів, які не були визнані в попередніх тестах, також для підтвердження результатів аналізу API, використовували молекулярні експерименти: виділення ДНК бактерій, електрофорез ДНК в

агарозному гелі, полімеразна ланцюгова реакція ДНК і секвенування ДНК. Молекулярні тести проводили в центрі Wahj Al DNA Багдад [22].

#### 2. 6. 4. 1 Виділення та аналіз ДНК бактерій

Виділили ДНК з ізолятів бактерій проводили за допомогою набору G-spin DNA extraction, intron biotechnology, cat. no 17045 / (Корея). До складу набору входили розчини необхідних буферів, РНКаз А (Ліофілізований порошок) та протеїнази К (Ліофілізований порошок) (Табл. 2.2).

Таблиця 2.2

#### Вміст набору G-spin DNA, intron biotechnology, cat. no 17045

Назва матеріалів	Вміст 50 колонок
Буфер CL	25 мл
Буфер BL	25 мл
Буфер WA	40 мл
Буфер WB	10 мл
Буфер CE	20 мл
розділова колона (Spin Column) / пробірці збору	50
РНКаз А (Ліофілізований порошок)	3 мг x 1 флакон
Протеїназа К (Ліофілізований порошок)	22 г x 1 флакон

Процес виділення ДНК проводили згідно з протоколом наданого набору. Для цього перенесли 1 ~ 2 мл культивованих клітин в пробірку об'ємом 2 мл. Пелет клітини центрифугували протягом 1 хв. при 13000 об / хв, і відкидали супернатант. Ресуспендіровали повністю осад клітин із залишком супернатанта натиснувши або енергійно струшуючи. До зразків додавали 200 мкл буфера CL, 20 мкл протеїнази К та 5 мкл розчину РНКаз А і енергійно перемішували. Інкубували лизат при 56 °С протягом 10 ~ 30 хв.

Після повного лізису додали 200 мкл буфера BL в пробірку і ретельно перемішали. Потім інкубували суміш при 70 °C протягом 5 хвилин.

Центрифугували зразки при 10000 g протягом 5 хвилин, щоб видалити нелізовані частки тканини. Потім обережно переносили 350 ~ 400 мкл супернатанту в нову пробірку об'ємом 1,5 мл. Додавали 200 мкл абсолютного етанолу в лизат і добре перемішували 5 - 6 разів.

Після перемішування короткочасно центрифугували пробірку об'ємом 1,5 мл, щоб видалити краплі зсередини кришки. Обережно переносили розчин в розділову колону (Spin Column) та пробірці для збору 2 мл (Рис 2.4), та закривали кришку. Потім центрифугували при 10000 g протягом 1 хв. Відкидали фільтрат і помістили розділову колону (Spin Column) в пробірку збору 2 мл. Додали 700 мкл буфера WA в розділову колону без змочування обода і центрифугували протягом 1 хв при 10000 g. Відкидали фільтрат і знову використовували пробірку збору. Додавали 700 мкл буфера WB в розділову колону без змочування обода і центрифугували протягом 1 хв при 10000 g.



Рис 2.4 Фотографія та схема роздільної колонки, яку використовували при виділенні ДНК

Відкидали фільтрат і помістили колону в пробірку збору об'ємом 2 мл. Потім знову центрифугували протягом 1 хв., щоб висушити мембрану. Відкидали проточною і збірною трубкою в цілому. Помістили розділову колону (Spin Column) в нову 1,5 мл пробірку і додали 30-100 мкл буфера CE прямо

на мембрану. Інкубували протягом 1 хв. при кімнатній температурі і потім центрифугували протягом 1 хв. при 13000 g для елюювання.

#### **2. 6. 4. 2 Електрофорез ДНК в агарозному гелі**

Після екстракції ДНК зразки підтвердили результати процесу і аналізували за допомогою гель-електрофорезу.

Згідно Sambrook і співавторам [229], агарозний гель готували з 1,5 % конденсацією шляхом плавлення 1,5 г агарози (Агароза- 8100.11- Conda / USA) в 100 мл попередньо приготованого буфера TBE (Tris-borate-EDTA) (Буфер TBE 10 X- IBS.BT004- Conda / USA). Розчин агарози доводили до кипіння, потім залишали остигати при (45-50 °C). Гель наливали в розливну пластину так, щоб утворилися отвори для зразків ДНК. Гель наливали акуратно, щоб не утворилися бульбашки повітря, і залишали на 30 хвилин для охолодження. Гребінець була акуратно видалена з твердої агарози. Пластину вставляли в горизонтальний блок електрофорезу, резервуар якого заповнювали буфером TBE так, щоб буфер покривав поверхню гелю.

Зразки ДНК в обсязі 5 мл вносили в 3 мкл буфера (Завантажений барвник (6X Loading dye- 21161 Intron / Korea). Отриманий розчин завантажували в отвори в гелі. Поділ проводили при 5 вольт / с2 протягом 1-2 години. Потім гель поміщали в розчин (3 мкл Redsafe розчин фарбування нуклеїнових кислот і 500 мл дистильованої води) для фарбування нуклеїнової кислоти. Гель проявляли в ультрафіолетовому випромінюванні при довжині хвилі 336 нм.

Розчин RedSafe для фарбування нуклеїнових кислот-21141-Intron / Korea - це нове і безпечне фарбування нуклеїнових кислот, альтернатива традиційному фарбуванню етідійбромідом (EtBr) для виявлення нуклеїнових кислот в агарозних гелях.

### 2. 6. 4. 3 Полімеразної ланцюгової реакції ДНК

Для збільшення кількості копій, досліджуваних ДНК проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з використанням набору Maxime PCR Premix (in-Taq) 25025- Intron / Korea (Табл.2.3).

Цей набір може досягти найкращого результату з максимально зручною системою. Перша причина в тому, що він має всі компоненти для ПЛР, тому ми можемо зробити ПЛР, просто додавши ДНК-шаблон, набір праймерів і DW. Друга причина в тому, що у нього є буфер завантаження гелю для електрофорезу, тому ми можемо робити завантаження гелю без будь-якої обробки. Він підходить для досвіду різних зразків швидким і простим методом.

Таблиця 2.3

#### Вміст набору Maxime PCR PreMix kit (i-Taq)

Матеріал	Концентрація
i-Taq ДНК-Полімераза	5U/ $\mu$ l
DNTPs	2.5mM
Буфер реакцій (10X)	1X
Буфер для завантаження гелю	1X

В якості праймерів використовували The specific primer 16S rRNA of gene (IDT компанії - Integrated DNA Technologies, Канада) в центрі Wahj Al DNA Багдад / Ірак [249] (Табл. 2.4). Ліофілізовані праймери розчиняли в ddH<sub>2</sub>O до кінцевої концентрації 100 пмоль / л в якості основного розчину та зберігали при -20 °C. Концентрація робочого розчину праймера становила 10 пмоль / л.

Таблиця 2.4

**Характеристика праймерів, які синтезували для синтезу 16S рРНК бактерій**

праймер	Послідовність	Tm (°C)	GC (%)	Розмір продуктів
Прямий	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'	54.3	50.0	1250 base pair
Зворотний	5'- GGTACCTTGTTACGACTT- 3'	49.4	42.1	

Після проведення ПЛР аналізували отримані копії ДНК за допомогою спеціального розчину на основі специфічної взаємодії з генами (Табл. 2.5).

Таблиця 2.5

**Розчин для діагностики гена**

Складові частини	Концентрація
Taq PCR PreMix	5 мкл
Прямий праймер	10 пикомол/мкл
Зворотний праймер	10 пикомол/мкл
ДНК	1.5 мкл
Дистильована вода	16.5 мкл
Остаточний обсяг	25 мкл

Для визначення розміру отриманих ДНК після ПЛР проводили гель електрофорез зразків ДНК у 2 % агарозному гелі з використанням набору KAPA Universal DNA Ladder (cat # KK6302) при 5 вольт / см<sup>2</sup>, 1х буфера TBE протягом 1:30 годин (Рис. 2.5).



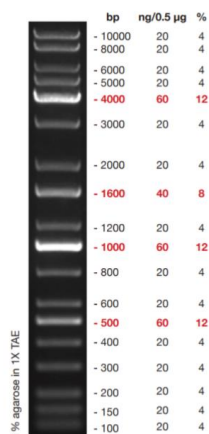


Рис. 2.5 Універсальний DNA Ladder (cat # KK6302) - свідок, який використовується в гель-електрофорезі

#### 2. 6. 4. 4 Метод секвенування ДНК

Після ПЛР проводили секвенування отриманих фрагментів ДНК в дослідницькому центрі (Macrogen, Корея). Генетичну відповідність визначали за програмою BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), яка дає відповідну кореляцію генів 16s рРНК з іншими генами відомих штамів мікроорганізмів та доступний в Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI) (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>).

Таким чином, ідентифікували рід, тип та штам кожного ізольованого зразка бактерій, виявлених на поверхнях насіння пшениці та гороху після різних способів передпосівної обробки [21, 22, 24].

### 2. 7 Оцінка біологічної активності корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху

#### 2. 7. 1 Оцінка антиоксидантних властивостей КЕМ пшениці

Антиоксидантну активність корневих ексудатів оцінювали за їхньою здатністю зменшувати накопичення продуктів, активних до тіобарбітурової

кислоти (ТВА), в суспензії ліпопротеїнів жовтка, як описано Klebanov G. I. et al. [138]

Антирадикальна активність (ефективність видалення радикалів  $\text{OH} \bullet$ ) кореневих ексудатів визначалася за їхньою здатністю пригнічувати руйнування дезоксирибози радикалами  $\text{OH} \bullet$ , що утворюються в системі з  $\text{Fe}^{2+}$ , ЕДТА,  $\text{H}_2\text{O}_2$  та аскорбатом [107].

Антиоксидантну й антирадикальну активність висловлювали у відсотках відносно контролю. Етиловий спирт (5 мг / мл) та токоферол (7 мг / мл) відповідно використовували в якості стандартів [107].

## **2. 7. 2 Вплив КЕМ пшениці на швидкість синтезу ДНК та РНК в клітинах печінки щурів після часткової гепатектомії**

Експерименти проводили на 3-місячних самцях щурів лінії Вістар. З метою дослідження 25 тварин були розділені на 5 експериментальних груп по 5 тварин у кожній групі. Одна група була інтактною, а друга - контрольною (отримувала фізіологічний розчин після часткової гепатектомії) та 3 експериментальні групи: отримували розчини кореневих екзометаболітів по 0,1, 0,5 та 1,0 мг сухого КЕМ / 100 г маси тіла, за годину після часткової гепатектомії відповідно. Кореневі екзометболіти 1-денних проростків ліофілізували в вакуумі. Згодом зразок був розчинений у фізіологічному розчині та введений тваринам. Часткова гепатектомія була виконана класичним методом Hagens and Anderson [120].

Швидкість синтезу ДНК та РНК в клітинах печінки визначали через 22 години після операції, що відповідає піку їх синтезу. За 1 годину до забою тварин радіоактивні попередники синтезу ДНК -3 Н-тимідин 2,5 МБк / 100 г маси тіла, а РНК – 14 С-оротинова кислота 1,0 МБк / 100 г вводили тваринам всіх груп.

Тварин умертвляли ефірної анестезією, а нуклеїнові кислоти виділяли з печінки, як описано [3]. У кожному зразку кількість ДНК та РНК визначали

спектрофотометрично при довжині хвилі 270, 290 нм. Радіоактивність аліквот визначали за допомогою лічильника радіоактивності Beckman (США) та данні виражали у вигляді питомої активності СРМ / хв • мг ДНК або РНК. Пул радіоактивно мічених попередників ДНК та РНК був однаковим у всіх зразках, що показує швидкість синтезу нуклеїнової кислоти в системі *in vivo* [147].

### **2. 7. 3 Використання КЕМ пшениці та гороху в якості поживного середовища для росту різних видів бактерій**

Зерна пшениці та гороху обробляли контрольним, 1-м та 2-м способами передпосівної обробки. Для цього зерна окремо промивали проточною водою по 3 хвилини і 3 рази дистильованою стерильною водою, 0,05 % розчином перманганату калію ( $K_2MnO_2$ ) і знову стерильною дистильованою водою. Після промивання зерна пшениці та гороху замочували у стерильній дистильованій воді на 24 години при 26 °С.

Через 24 години відбирали зернівки, які не проклонулися, інші зернівки промивали та культивували в дистильованій стерильній воді в проточному режимі протягом двох діб в умовах цілодобового освітлення і при температурі 25 °С. На першу добу росту проростки пшениці та гороху промивали дистильованою водою, додавали певну кількість стерильної дистильованої води і культивували їх за тих же умов.

На другу добу росту збирали кореневі екзометаболіти проростків пшениці та гороху. Упарювали їх в 2 рази за обсягом і на їх основі готували живильні середовища для мікроорганізмів. Для цього в водні упаренні КЕМ додавали 3 % агар. Приготовлені розчини розливали в чашки Петрі по 15 мл і автоклавували при  $T = 121$  °С (1 атмосфера), 20 хвилин. Контрольним середовищем було універсальне мясо-пептонне середовище на 3 % агарі.

Активовані мікроорганізми чистих культур (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus popilliae*,

*Bacillus cereus*) висаджували на тверді поживні середовища на основі КЕМ пшениці та гороху і на МПА в обсязі 5 мкл. Мікроорганізми культивували при температурі 36 °С протягом 24 годин. Потім порівнювали ріст бактерій на живильних середовищах на основі КЕМ пшениці, КЕМ гороху та на основі МПА.

Динаміку росту культур мікроорганізмів оцінювали за площею колоній. Для цього через кожні 3 години фотографували колонії та за допомогою комп'ютерної програми Axio vision визначали площу колоній, яку висловлювали в умовних одиницях[25].

#### **2. 7. 4 Використання КЕМ пшениці та гороху в якості середовища проростання для гороху та пшениці відповідно**

Для визначення впливу корневих екзометаболітів гороху на ріст пшениці та екзометаболітів пшениці на ріст коренів гороху використовували наступну схему (Рис. 2.6).

Зерна пшениці та гороху обробляли 3-ма способами передпосівної обробки (контрольний, 1-й та 2-й спосіб), як описано вище в (Рис. 2.1).

Зернівки пшениці та гороху, які проклінулися, розкладали в чашки Петрі та додавали дистильовану (дист.) воду: для пшениці - 50 зерен + 7 мл дист. води, а для гороху - 25 зерен + 10 мл дист. води. Культивували зерна при  $T = 24^{\circ}\text{C}$ . Через 24 години збирали 1-добові КЕМ пшениці та 1-добові КЕМ гороху. Визначали довжину кореня в кожній чашці Петрі. Після цього промивали зерна стерильною дистильованою водою. У чашки з зернами пшениці додавали зібрані 1-добові КЕМ гороху в обсязі 7 мл. У чашки з зернами гороху додавали зібрані 1-добові КЕМ пшениці в обсязі 10 мл. Тобто, здійснювали реципрокне перенесення отриманих КЕМ. В якості контролю були чашки Петрі з зернами гороху та пшениці, в які додавали по 10 мл та 7 мл дист. води відповідно. Культивували зерна при  $T = 24^{\circ}\text{C}$ .

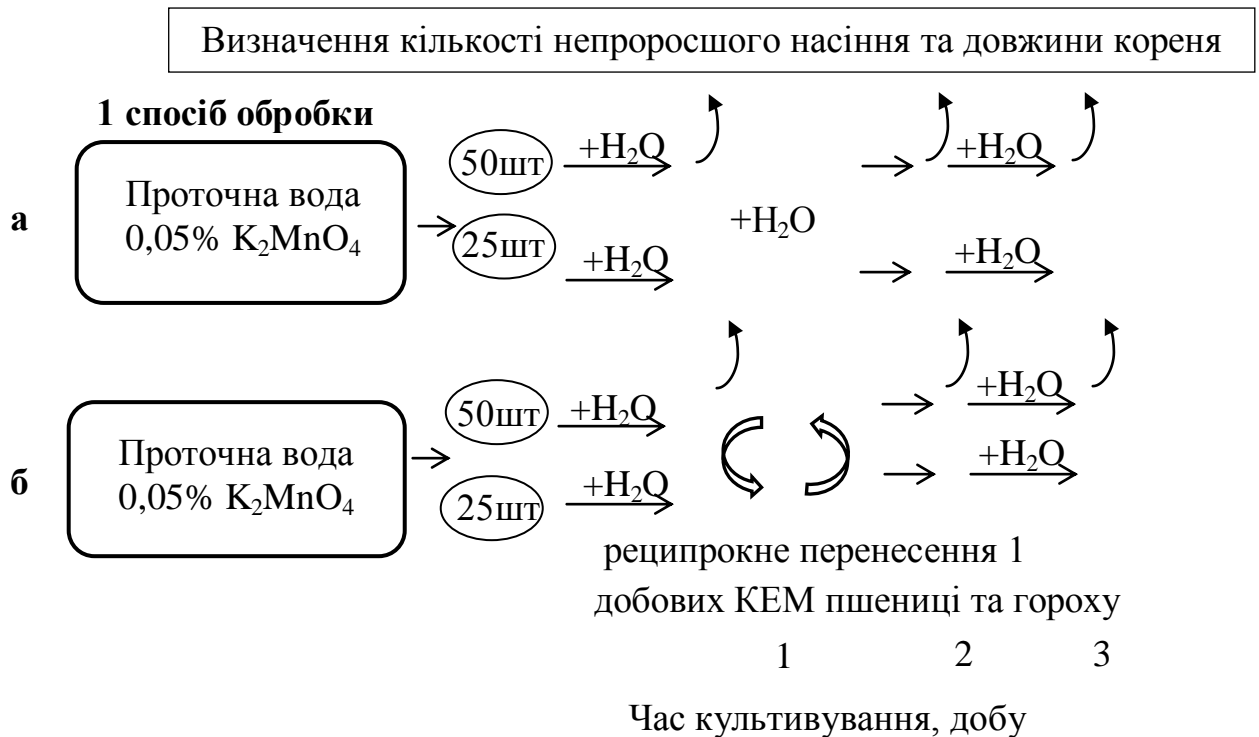


Рис. 2.6 Схема експерименту реципрокного внесення 1-добових КЕМ пшениці та гороху на прикладі 1 способу передпосівної обробки насіння

а - контрольний варіант, коли в чашки Петрі на 1 добу росту вносили дист. воду; б - експериментальний варіант, коли в чашки Петрі на 1 добу росту вносили 1-добові КЕМ

На 2 добу росту визначали довжину кореня та кількість непророслих зернівок. У чашки з зернами пшениці та гороху додавали по 2 мл та 4 мл стерильної дистильованої води відповідно. На 3 добу росту також визначали довжину кореня проростків.

## 2. 7. 5 Використання рідких ґрунтових культур мікроорганізмів в якості середовища проростання для насіння пшениці та гороху

Для визначення впливу ґрунтових мікроорганізмів на ріст коренів насіння пшениці та гороху використовували схему, представлену на рисунку 2.6. В даному експерименті замість КЕМ на 1 добу росту вносили

рідкі культури мікроорганізмів *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae*. Для цього культури мікроорганізмів активували на мясо-пептонному бульйоні та культивували протягом 24 годин при температурі 25 °С.

Зерна пшениці та гороху обробляли 3-ма способами передпосівної обробки (контрольний, 1-й та 2-й спосіб) та розкладали в чашки Петрі, як описано вище в п. 2.1.

В кінці першої доби росту рахували кількість непророслих зерен та довжину коренів. Промивали зерна дистильованою водою і вносили 1 добові рідкі культури мікроорганізмів в обсязі 7 мл та 10 мл в чашки Петрі з зернами гороху та пшениці відповідно. У контрольні чашки Петрі вносили по 7 мл та 10 мл дистильованої води відповідно.

На другу та третю добу росту рахували кількість непророслих зерен та довжину кореня насіння пшениці та гороху.

## **2. 8 Статистична обробка**

Всі експерименти були проведені в 3 біологічних та 3 аналітичних повторностях. В чашки Петрі розкладали по 25 зерен гороху та по 50 зерен пшениці. Таким чином, для кожного експериментального варіанта було використано 225 зерен гороху й 450 зерен пшениці. Для кожного показника були розраховані середні значення та стандартна помилка середнього. Відмінності між показниками аналізували з використанням непараметричного U-критерію Манна-Уїтні [168]. Відмінності вважалися статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## **Висновки до розділу 2**

В даному розділі наведено схеми експериментів щодо передпосівної обробки насіння пшениці та гороху, проточного культивування та збору корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, реципрного

внесення 1-добових КЕМ пшениці та гороху. Наведено методи визначення загального білка, вуглеводів, вільних амінокислот, молекулярні методи визначення епіфітних бактерій насіння пшениці та гороху, методи визначення біологічної активності корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху та методи культивування різних видів мікроорганзмів на живильних середовищах. Вказано які статистичні методи оцінки отриманих результатів були використані.

Методичні рекомендації були використані у власних публікаціях [2, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 47, 142, 147].

## **РОЗДІЛ 3**

### **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ**

#### **3. 1 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на інтенсивність росту проростків та активність екскреторної системи кореня у водній культурі**

##### **3. 1. 1 Вплив різних способів обробки насіння на схожість та інтенсивність росту коренів пшениці**

Передпосівна обробка насіння повинна забезпечити видалення супутніх мікроорганізмів, що знаходяться на поверхні насіння, які можуть пригнічувати ріст проростків, або інактивувати їх, при цьому вона не повинна впливати на схожість насіння та інтенсивність росту коренів.

Виявили, що в контрольному варіанті 26 % насіння пшениці до кінця першої доби не проросли, однак до 3-ї доби залишалося непророслих тільки 6 % (Табл. 3.1). Отже, в контрольному варіанті були насіння, які проросли на 1 добу, а також які проросли тільки до 3 діб. Так, якщо за 1 добу проросло 74 % від усіх насінь, за наступну 2 добу проросло ще 12 %, за 3 добу ще 8 % (Табл. 3.1) та непророслих до 3 доби в контрольному варіанті залишилося тільки 6 % насіння (Табл. 3.1). Така особливість насіння залежить від термінів зберігання, умов культивування або сортових особливостей.

У тому випадку, якщо ті ж насіння пшениці обробляли 0,05 % розчином перманганату калію (1-й спосіб обробки) динаміка схожості насіння мало відрізнялася від контрольної. Так, за 1 добу проросло 72 % насіння, за наступну 2 добу ще 15 %, а за 3 добу ще 3 %, непророслих залишалося 10 %, що на 4 % більше контролю (Табл. 3.1).



Таблиця 3.1

**Кількість насіння пшениці, які непроросли (проросли) для 1-, 2- та 3-добових проростків пшениці після різних способів передпосівної обробки**

Доба росту	Кількість насіння, які непроросли (проросли),%			
	Контроль	1-й спосіб (0,05% розчином перманганату калію)	2-й спосіб (30 сек. 70% спирт, 30 хв. 5% гіпохлорит натрію)	3-й спосіб (5 хв. 70% спирт і 40 хв. 5% гіпохлорит натрію)
1 доба росту	26±3 (74±3)	28±3 (72±3)	36±1 (64±1)	13±2 (87±2)
2 доба росту	14±1 (86±1)	13±2 (87±2)	19±2 (81±2)	10±4 (90±4)
3 добу росту	6±3* (94±3)	10±4* (90±4)	15±3* (85±3)	16±3 (84±3)

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

У тому випадку, якщо насіння пшениці обробляли 70 % спиртом та 5 % гіпохлоритом натрію (2-й спосіб обробки), то це гнітило схожість насіння на 10 % в порівнянні з контролем. Так на 1 добу проросло лише 64 %, а до 3 доби росту непророслих було на 9 % більше, ніж в контролі (Табл. 3.1).

Отже, 2-й спосіб обробки насіння (більш «жорсткий») приводив до загибелі частини насіння. Виявили, що після 3-го способу передпосівної обробки кількість непророслих зерен на 1 добу росту становило 13 %, що в 2 рази менше в порівнянні з контролем. Слід зазначити, що кількість непророслого насіння після 3-го способу обробки не змінювалося з 1 по 3 добу росту культивування насіння пшениці (Табл. 3.1). Кількість пророслого насіння становило 87 % протягом усього періоду культивування проростків пшениці. Отже, цей спосіб обробки насіння збільшував схожість

насіння пшениці на 1 добу росту в порівнянні з контрольним варіантом, але при цьому кількість непророслих насіння на 3 добу росту було в 2 рази більше, ніж в контрольному варіанті.

Таке пригнічення схожості насіння може бути обумовлено різними причинами: загибель зародка, порушення системи поглинання насіння води, гальмування швидкості розвитку зародка. Разом з тим, невелике пригнічення схожості насіння може не впливати на інтенсивність росту проросшого насіння.

У наступній серії експериментів визначали інтенсивність росту проростків з 1 по 3 добу [27]. Довжина коренів проростків пшениці в контрольному варіанті за 1 доби росту досягала 0,76 см, а до 2 діб 1,89 см та до 3 діб коріння мали довжину 2,78 см (Рис. 3.1а). Якщо уявити дані питомої швидкості росту коренів контрольного варіанту, то найбільшим приріст був на 2 добу, а до 3 доби вона кілька зменшувалася (Рис. 3.1Б).

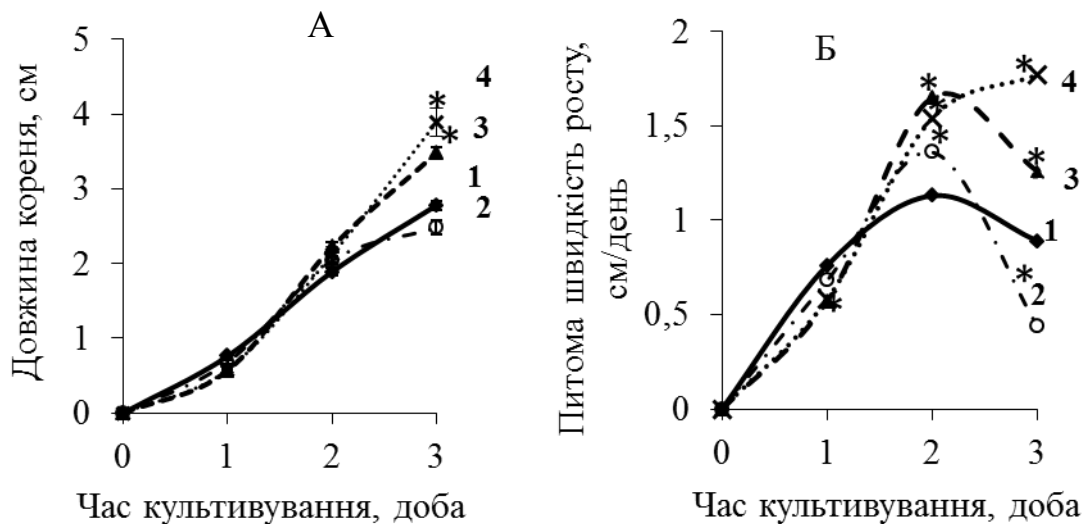


Рис. 3.1 Довжина проростків пшениці (А) та питома швидкість їхнього росту (В) в контрольному варіанті (1) та після передпосівної обробки: 2 - обробка перманганатом калію, 3 - етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію (етиловий спирт - 30 сек., гіпохлорит натрію - 30 хв.); 4 - етиловий спирт (5 хв.) та гіпохлорит натрію (40 хв.)

\* -  $P \leq 0,05$  в порівнянні з контролем

Якщо насіння обробляли 1-м способом, то це мало вплив на інтенсивність росту коренів. Вони інтенсивніше росли на 2 добу, проте в подальшому вони відставали по довжині від контрольного варіанту та це наочно видно по питомій швидкості росту (Рис. 3.1а, Б). Дещо несподіваний результат був отриманий в разі 2-го способу обробки насіння. Так, якщо протягом 1 доби росту довжини кореня у них сягала лише 0,57 см, тобто на 25 % була меншою контролю і, отже, питома швидкість росту достовірно було менше контролю, то на 3 добу довжина кореня була на 25 % більше контролю (Рис. 3.1а). Питома швидкість росту на 2 добу росту значно перевершувала як контрольний, так та 1-й спосіб обробки насіння (Рис. 3.1Б).

Так, якщо в 1 добу питома швидкість росту для контролю становила 0,76 см / 24 години, для першого способу обробки - 0,68 см / 24 години, а для другого способу - 0,57 см / 24 години, то для 3 доби росту проростків вона становила відповідно 0,89; 0,44 та 1,26 см / 24 години (Рис. 3.1Б).

Якщо порівняти ці три експериментальних варіанти передпосівної обробки насіння, то необхідно відзначити, що, якщо в контролі питома швидкість росту кореня на 3 добу збільшувалася в порівнянні з 1 добою на 17 %, в разі першого способу обробки вона зменшувалася на 36 %, а для другого способу обробки питома швидкість росту збільшувалася на 121 % (Рис. 3.1). Отже, в разі «жорсткої» передпосівної обробки насіння пшениці мало місце ефект «пригнічення росту з подальшою стимуляцією росту».

Представляло інтерес збільшити час обробки спиртом до 5 хвилин та гіпохлоритом натрію до 40 хвилин та визначити інтенсивність росту проростків. Виявилось, що такий жорсткий спосіб обробки насіння пшениці, який супроводжувався загибеллю частини насіння на 3 добу росту супроводжувався стимуляцією швидкості росту проростків саме на 3 добу (Рис. 3.1).

Така стимуляція інтенсивності росту коренів, які проростали, короткостроковою передпосівною обробкою насіння 70 % спиртом та 5 % гіпохлоритом натрію на тлі пригнічення схожості насіння може бути

викликана кількома причинами: 1) ефектом синхронізації клітинного циклу; 2) гормезісним ефектом; 3) змінами в співвідношенні між формуючою мікробіотою кореня і її впливу на інтенсивність росту.

Говорячи про гормезісний ефект, необхідно відзначити, що малі «обурення» здатні надавати стимулюючі ефекти [56, 71] і в даній постановці він міг мати місце.

І нарешті, відомо, що інтенсивність росту залежить від кількісного та якісного складу мікроорганізмів, які формують кореневу ризосферу та забезпечують кореневе живлення рослин.

Відомо, що «заселення» ризосфери кореня мікроорганізмами залежить від складу корневих екзометаболітів, які виділяються коренем. У зв'язку з цим, дослідження якісного та кількісного складу корневих екзометаболітів представляє великий інтерес в розумінні факторів, що впливають на цей процес.

Основними компонентами мікрооточення кореня є вуглеводи, білки та вільні амінокислоти [73]. Так як, кореневі екзометаболіти здійснюють прямий та опосередкований (через регуляцію якісного та кількісного складу мікробіоти) вплив на інтенсивність росту, то на наступному етапі роботи визначали якісний та кількісний склад корневих екзометаболітів у разі різних способів передпосівної обробки насіння пшениці.

### **3. 1. 2 Якісний та кількісний склад корневих екзометаболітів після різних способів передпосівної обробки насіння пшениці**

Екскреторна активність коренів контрольного варіанту багаторазово збільшувалася з 1 по 3 добу росту в водній культурі. Так, якщо за 1 добу в водному середовищі виявлялося 1418 мкг екзометаболітів на 100 коренів, після закінчення 2 доби - 2739 мкг / 100 коренів, через 3 доби їх було 5880 мкг / 100 коренів (Рис. 3.2). Отже, якщо за другу добу кількість екзометаболітів збільшилася на 1321 мкг / 100 коренів в порівнянні з

1 добою, то на третю добу в порівнянні з другою добою - на 3141 мкг / 100 коренів, тобто мав місце майже експоненціальний ріст кількості екзометаболітів в разі контрольного варіанту (Рис.3.2).

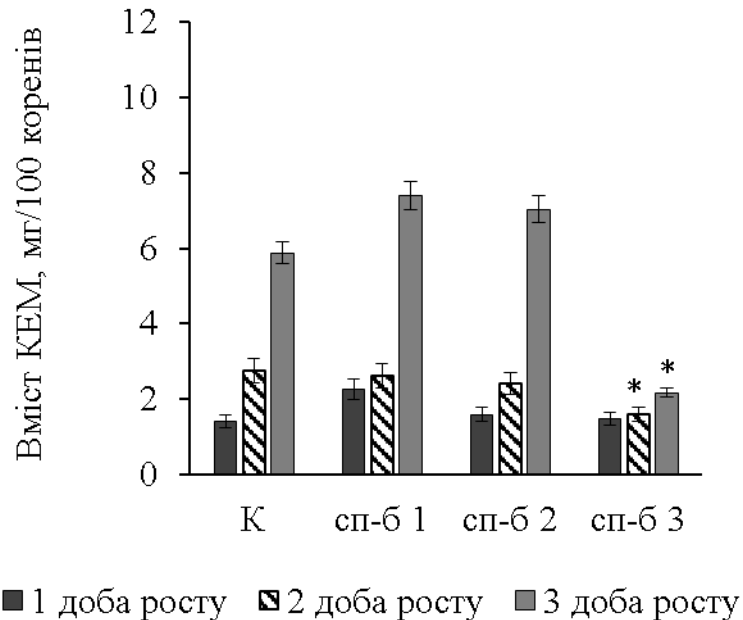


Рис. 3.2 Вміст загальної кількості корневих екзометаболітів у корневих екзометаболітів 1-, 2- та 3-добових проростків пшениці після різної передпосівної обробки: К - контрольний варіант; сп-б 1 - обробка перманганатом калію, сп-б 2 - етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію (етиловий спирт - 30 сек, гіпохлорит натрію - 30 хв); сп-б 3 - етиловий спирт (5 хв) та гіпохлорит натрію (40 хв)

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

У тому випадку, якщо насіння пшениці обробляли перманганатом калію, то інтенсивність кореневої екскреції в першу добу росту була на 60 % більше в порівнянні з контрольним варіантом (Рис. 3.2). Однак, на 2 добу росту вона залишалася такою, як і у 1-добових проростків та не відрізнялася від контролю (Рис. 3.2). Однак на 3 добу росту кількість екскретуючих речовин збільшувалася в порівнянні з 2 добою на 4790 мкг / 100 коренів і перевершувало контрольний варіант на 25 % (Рис. 3.2).

Отже, перший спосіб передпосівної обробки насіння прискорював швидкість виділення корневих екзометаболітів та впливав на динаміку цього процесу (Рис. 3.2).

Подібний характер екскреторної активності мав місце і в разі 2-го способу передпосівної обробки насіння (Рис. 3.2). Різниця лише в тому, що інтенсивність екскреції у 1 та у 2 добових проростків не відрізняється від контрольного варіанту, а на 3-ю добу вона перевершувала контрольний варіант на 20 % та була близька до 1-го способу обробки в цей час (Рис. 3.2).

Обробка насіння пшениці 3-м найбільш «жорстким» способом обробки показала відсутність його впливу на інтенсивність екскреції у 1-добових проростків в порівнянні з контролем. Пригнічення екскреторної активності спостерігали у 2 добових проростків і на 3 добу росту проростків (Рис. 3.2).

Раніше було показано наявність зворотної залежності між інтенсивністю росту коренів та їх екскреторної активністю [142]. Такий ефект був виявлений після 3-го способу передпосівної обробки насіння пшениці.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що передпосівна обробка насіння пшениці, по-перше, може бути використана для індукції екскреторної активності в корневих біотехнологіях, так як дозволяє отримувати до 7,5-8 мг корневих екзометаболітів на 100 зерен. По-друге, впливати на інтенсивність росту та розвиток рослин, регулюючи склад та кількість компонентів, які формують мікрооточення кореня [27].

Разом з тим, найважливішими характеристиками впливу способів обробки насіння на екскреторну активність та розуміння біологічної ролі корневих екзометаболітів є їх склад, а точніше співвідношення між основними компонентами екзометаболітів.

Незважаючи на широкий спектр речовин екскретіруємих кореневої системи, більше 90 % з них припадає на 3 основних компоненти: цукру, білки та вільні амінокислоти, принаймні для пшениці [147].

На наступному етапі роботи визначали вміст загальних цукрів, білків та амінокислот в складі корневих екзометаболітів насіння пшениці після різних способів передпосівної обробки насіння.

Вміст вуглеводів за 1 добу росту коренів контрольного варіанту становило 950 мкг глюкози / 100 проростків, що становило 67 % від загальної кількості корневих екзометаболітів (Табл. 3.2). За наступну 2-у добу воно збільшувалося на 41 % в порівнянні з 1 добою, а за 3 добу кількість вуглеводів становило 3311 мкг глюкози / 100 зерен, що було на 146 % більше у порівнянні з 2 добою у контрольного варіанту (Табл. 3.2).

*Таблиця 3.2*

**Вміст вуглеводів, загальних білків та амінокислот в корневих екзометаболітах 1-, 2- та 3-добових проростків пшениці після різної передпосівної обробки насіння**

Вміст КЕМ	Доба росту	Конт- роль	Способи обробки		
			1-й спосіб	2-й спосіб	3-й спосіб
Вуглеводи, мкг глюкози / 100 зерен	1	949,7±	1527,3±	1136,4±	309,4±
		106,2	458,4*	93,5	27,7
	2	1342,8±	1582,3±	1227,3±	314,5±
		98,2	169,4	123,8	30,1
	3	3311,5±	4929,3±	4546,2±	245,9±
		318,3	507,9*	432,3*	37,6
Загальний білок, мкг / 100 зерен	1	338,5±	593,1±	311,0±	1057,3±
		40,8	108,4*	46,6	63,2
	2	693,8±	410,2±	382,5±	1157,3±
		101,4	103,8*	46,2*	19,98
	3	1456,3±	1344,9±	1359,7±	1804,4±
		158,4	156,9	184,7	189,7

Продовження таблиці 3.2

Вільні амінокислоти, мкг / 100 зерен	1	130,0± 14,7	141,3± 11,2	143,7± 11,4	106,3± 7,9
	2	702,4± 55,2	614,7± 29,1	799,8± 36,4	129,9± 10,7
	3	1112,2± 64,4	1122,9± 66,5	1132,3± 113,4	127,6± 6,8

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

Динаміка екскреторної активності цукрів коренів після 1-го та 2-го способу передпосівної обробки насіння в загальному повторювала таку загальних екзометаболітів (Рис.3.3). Так, на 1 добу росту особливо після 1-го способу обробки коріння екскретуватися у водне середовище до 1527,3 мкг глюкози / 100 зерен, що було в 1,6 рази більше, ніж в контролі в цей час. Надалі на 2-у добу вміст цукрів залишався таким же, як і після 1 діб, на 3 добу екскреція посилювалася та вміст вуглеводів становив 4929,3 мкг глюкози / 100 проростків, що на 30 % більше в порівнянні з контролем в цей час і на 211 % більше у порівнянні з 2 добою росту (Табл. 3.2). Вміст цукрів у складі кореневих екзометаболітів після 2-го способу передпосівної обробки насіння пшениці не відрізнявся від контрольного варіанту у 1 та 2 добових проростків і був збільшений на 37 % у 3 добових проростків (Табл. 3.2).

Отже, передпосівна обробка насіння перманганатом калію збільшувала швидкість екскреції вуглеводів в середовище у 1 та 3 добових проростків.

Вміст білка в складі кореневих екзометаболітів у проростків пшениці контрольного варіанту збільшувалася з 1 по 3 добу культивування (Табл. 3.2). Так, його кількість у контрольній групі проростків з 1 по 3 добу збільшувалася в 3,5 раз (Табл. 3.2, Рис. 3.3).



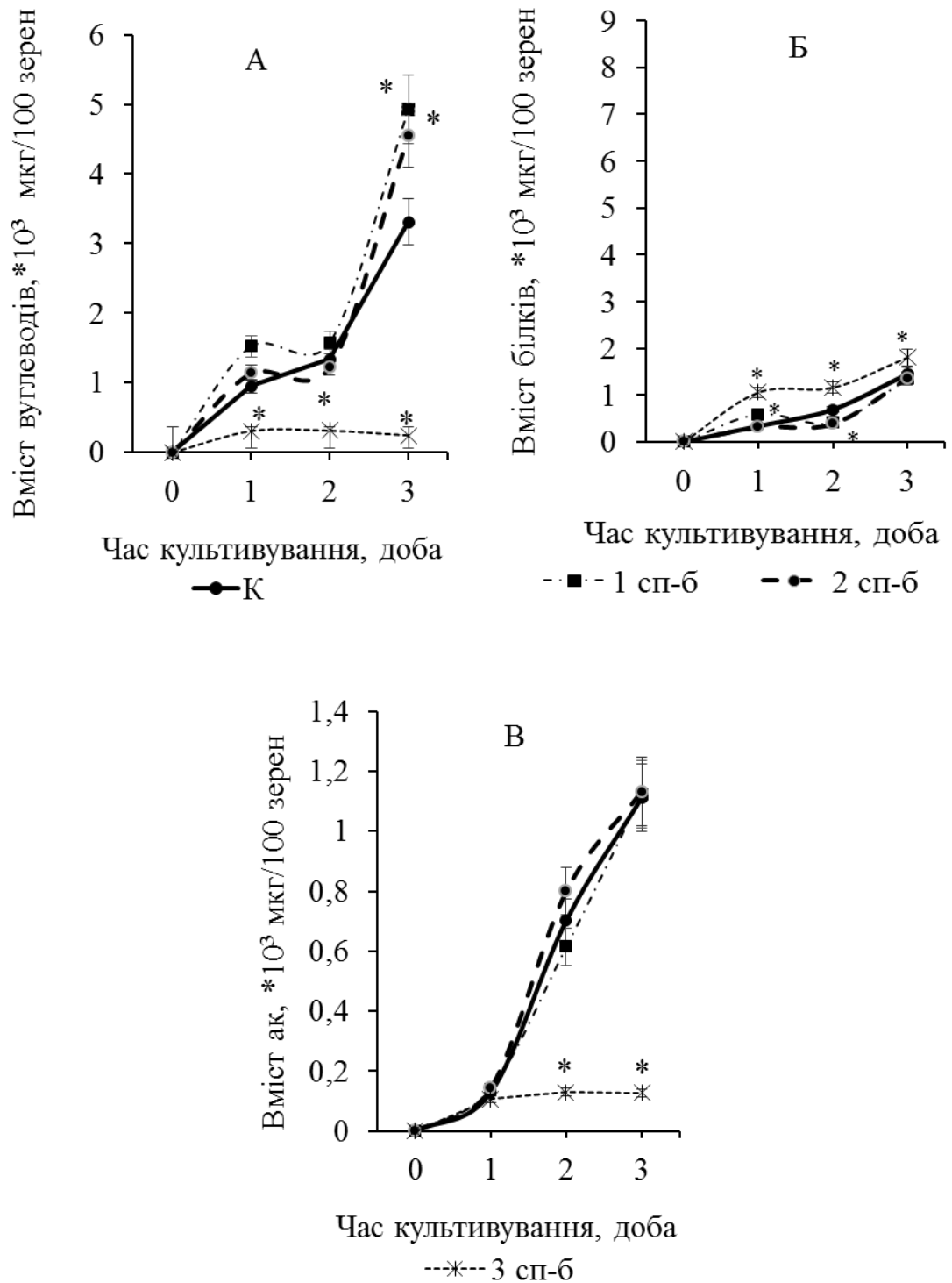


Рис. 3.3 Вміст вуглеводів (А), загальних білків (Б), вільних амінокислот (С) у складі коєневих екзометаболітів проростків пшениці на 1-, 2- та 3-ю добу росту при різній передпосівній обробці насіння

Передпосівна обробка насіння перманганатом калію збільшувала вміст білка в складі екзометаболітів 1-добових проростків на 75 %, а у 2 добових

проростків вміст білка було на 40 % менше в порівнянні з контрольним варіантом.

Обробка насіння етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію також призводило до зменшення вмісту білка у 2 добових проростків на 45 % в порівнянні з контролем (Табл. 3.2).

Передпосівна обробка насіння не впливала на вміст вільних амінокислот в складі корневих екзометаболітів з 1 по 3 добу росту при 1-му та 2-му способах передпосівної обробки насіння (Табл. 3.2). При цьому вміст амінокислот в складі корневих екзометаболітів збільшувався в 7,9 - 8 разів з 1 по 3 добу росту. При 3-му способі обробки вміст вільних амінокислот було нижче, ніж в контрольному варіанті і не змінювалося з 1 по 3 добу росту.

Слід зазначити, що інтенсивність екскреції амінокислот лінійно збільшувався з 1 по 3 добу культивування, а вміст білка та цукрів збільшувався нелінійно в процесі культивування при 1-му та 2-му способі передпосівної обробки насіння пшениці (Рис. 3.3).

Такі відмінності в динаміці екскреції різних компонентів приводило до зміни в співвідношенні між її компонентами у 1, 2, та 3 добових проростків, що необхідно враховувати при отриманні корневих екзометаболітів. Так, різні способи передпосівної обробки насіння приводили до зміни в складі вуглеводів та білків, особливо виражено це при 3-му способі передпосівної обробки (Рис. 3.4) [47].

Найважливішими компонентами мікрооточення кореня поряд з білками, амінокислотами і вуглеводами є мікробіота. Як відомо, мікроорганізми кореневої ризосфери з одного боку «утилізують» кореневі екзометаболіти, а з іншого боку, екскретують «свої» екзометаболіти і як наслідок змінюють мікрооточення кореня та можуть впливати на інтенсивність росту коренів і на склад одержуваних корневих екзометаболітів.

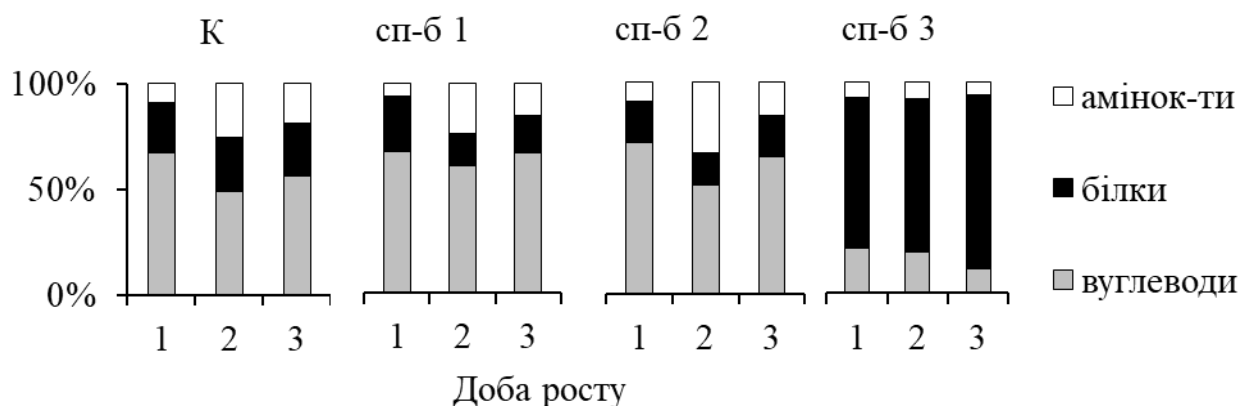


Рис. 3.4 Вміст вуглеводів, загального білка та вільних амінокислот в 1-, 2- та 3-добових корневих екзометаболітів при різній передпосівній обробці насіння

На наступному етапі роботи визначали вміст загальної кількості мікроорганізмів у 2 добових проростків пшениці після різних способів передпосівної обробки насіння і при культивуванні проростків у водній культурі з дотриманням асептичних умов.

### 3. 1. 3 Вплив передпосівної обробки насіння на кількість мікроорганізмів у 2 добових проростків пшениці у водній культурі

Культивування інокулянтів, отриманих з ризосфери проростків пшениці на агаризових середовищах з МПА, показало: 1- що в складі корневих екзометаболітів присутні мікроорганізми, які здатні розмножуватися на МПА (універсальна агаризована середовище); 2- в разі контрольного варіанту стаціонарна фаза росту культури наступала до 24 години з досягненням відносної площі колоній близько 4 тис. Ум од .; 3- в разі 1-го способу обробки насіння вихід в стаціонарну фазу культур мікроорганізмів відбувався також до 24 годин, однак відносна площа колоній була менше на 20-25 % в порівнянні з контрольним варіантом (Рис. 3.5); 4 - в разі, якщо інокулянт отримували у 2 добових проростків після 2-го способу, більш

жорсткого способу передпосівної обробки насіння, то вихід в стаціонарну фазу здійснювався до 6 годин, а відносна площа колоній була в 2 рази менше контрольного варіанту (Рис. 3.5) [27].

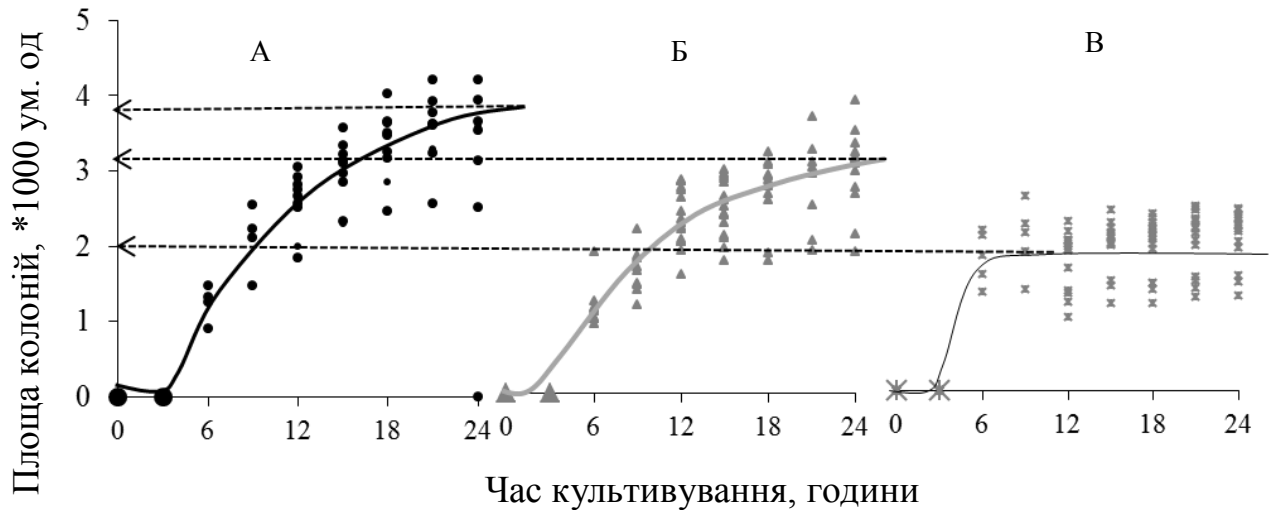


Рис. 3.5 Відносна площа колоній мікроорганізмів (умовні одиниці), виділених у 2 добових проростків пшениці після різної передпосівної обробки насіння і при культивуванні на агаризованому середовищі з МПА

А - контрольний варіант; Б - варіант обробки 0,05 % розчин перманганату калію; В - варіант обробки 70 % спирт та 5 % гіпохлорит натрію

Отже, передпосівна обробка насіння пшениці 0,5 % розчином перманганату калію незначно інактивувала мікроорганізми, які перебували на поверхні зерна. Обробка насіння 70 % етиловим спиртом та 5 % гіпохлоритом натрію інактивували більшу частину мікроорганізмів, які перебували на зерну та незначно затримували проростання насіння.

Результати цієї частини досліджень показали, що навіть відносно «м'яка» короткочасна передпосівна обробка насіння пшениці супроводжувалася невеликою затримкою в інтенсивності росту проростків, збільшенням інтенсивності екскреції корневих екзометаболітів, зміною

складу корневих екзометаболітів та зменшенням кількості мікроорганізмів в ризосфері кореня пшениці у водній культурі. Зміна цих показників залежало від способу передпосівної обробки насіння. Ці результати вказують на наявність взаємозв'язку між особливостями росту і функцією екскреторної системи. Використовуючи різні способи передпосівної обробки насіння, можна управляти процесом отримання корневих екзометаболітів.

Так, зокрема, передпосівна обробка насіння незначно затримувала швидкість росту проростків на 1 добу культивування і це супроводжувалося вираженим збільшенням питомої швидкості росту проростків на 2 добу. Слід зазначити, що до 3 доби питома швидкості росту знову зменшувалася (Рис. 3.1Б).

Отже, питома швидкості росту мала нелінійний, а виражений ритмічний характер. Передпосівна обробка насіння збільшувала амплітуду коливань ритмічного характеру питомої швидкості росту з 1 по 3 добу культивування.

Ми вважаємо, що ефект «затримки» росту з подальшою стимуляцією росту проростків може розглядатися як прояв гормезісного ефекту на моделі проростків. Як відомо, гормезісний ефект - стимуляція біологічних процесів малими дозами токсичних речовин або фізичних чинників, цей ефект описаний для різних видів радіації, показаний на моделі дії іонів важких металів та інших хімічних сполук [52, 253].

Необхідно відзначити, що між ступенем «затримки» росту коренів і подальшим ефектом посилення питомої швидкості росту проростків існує прямий взаємозв'язок для використаних в даній роботі способів передпосівної обробки насіння. Так, «м'який» спосіб обробки виявляв менший ефект, ніж «жорсткий» спосіб обробки насіння (Рис. 3.1Б).

Як відомо, гормезісний ефект може бути реалізований різними механізмами. У даному випадку, він може бути реалізований шляхом синхронізації проходження клітинного циклу клітин інтенсивно зростаючого кореня.

Відомо, що перші мітози клітин проростків проходять відносно синхронно, а в подальшому має місце асинхронність проходження клітинного циклу [116, 169, 182].

Затримка росту кореня після передпосівної обробки насіння може бути пов'язана з короткостроковою затримкою швидкості проходження клітинного циклу, а подальше «зняття» інгібуючого ефекту компонентів передпосівної обробки насіння супроводжується синхронним входженням клітин в цикл, що і проявляється у збільшенні питомої швидкості росту на 2 добу росту. Надалі, до 3 доби росту знову має місце асинхронність в проходженні клітинного циклу і, як наслідок, зменшення питомої швидкості росту проростків.

Звичайно, синхронізація клітинного циклу не єдиний фактор нелінійної швидкості росту проростків. Так, помітний внесок в цей процес може вносити і процес «розтягування» клітин кореня, тобто збільшення їх розміру. Однак, основою цього процесу, звичайно, є швидкість і спрямованість метаболізму клітин зростаючого кореня.

Одним з показників метаболічної активності є характеристика екскреторної системи кореня.

Раніше на моделі інгібування росту коренів фітотоксикантом - фтористим натрієм було показано виражене збільшення інтенсивності екскреції кореневих екзометаболітів пшениці [48, 50]. Низька швидкість росту проростків пшениці, яка була обумовлена природними термінами зберігання насіння, також супроводжувалася збільшенням екскреторної активності кореня. Отже, чим повільніше росте корінь, принаймні з 1 по 3 добу, тим активніше він екскретується в середу екзометаболітів [48, 50].

Результати цієї роботи підтверджують це положення і вказують на те, що такий зв'язок не є «жорстким», а «коридор» або діапазон взаємозв'язку цих показників досить широкий, що необхідно враховувати в технології отримання екзометаболітів.

Так, невелика затримка росту кореня після передпосівної обробки насіння «м'яким» способом (перманганат калію) супроводжувалася посиленням екскреторної активності у 1-добових коренів. Так, у 1-добових проростків збільшувалася швидкість екскреції на 60 % і при цьому змінювалося співвідношення між кореновими екзометаболіти в цей час. Прискорення швидкості росту на 2 добу супроводжувалося зменшенням швидкості екскреції коренових екзометаболітів. Зменшення питомої швидкості росту на 3 добу супроводжувалося збільшенням на 25 % швидкості екскреції коренових екзометаболітів.

У той же час більш «жорстка» обробка насіння спиртом і гіпохлоритом натрію не чинила вираженого ефекту стимуляції екскреторної активності.

Отже, процес екскреції регулюється різними чинниками і, ймовірно, існують як специфічні механізми екскреції, так і загальні механізми, які відображають загальний метаболічний рівень клітин кореня.

Як відомо, зростаючий корінь з перших годин росту формує своє специфічне мікрооточення. Дослідження високоспецифічної системи «корінь - мікрооточення» може бути проведено на моделі водної культури проростків. Знання особливостей формування системи «корінь-мікрооточення» важливо для фундаментальних основ фізіології рослин і для отримання біологічно активних сполук, тобто розвитку коренових технологій.

Необхідно відзначити, що компоненти мікрооточення кореня формуються з декількох джерел: 1- специфічної екскреторної системи кореня, представленої прикордонними клітинами кореня [50, 115], 2- продуктами деградації клітин зростаючого кореня, і 3- мікроорганізмами, «населюючими» ризосферу кореня, а також продуктами їх життєдіяльності [31, 41]. Так як в складі мікрооточення присутні ферменти і мікроорганізми, то його склад динамічно змінюється. Більш того, «внесок» зазначених складових компонентів мікрооточення в процесі росту кореня буде сильно змінюватися.

Якщо на 1-3 добу основний внесок до складу мікрооточення вносять екзометаболіти, то в подальшому, в процесі росту буде збільшуватися внесок компонентів деградації клітин і метаболітів мікроорганізмів.

Отже, з 1 по 3 добу росту проростків у водній культурі при збереженні асептичних умов росту, основними компонентами мікрооточення кореня є цукри, білки та амінокислоти, активно екскретучі у водне середовище.

Інтенсивність і склад цих екзометаболітів кореня в цей період залежать від умов культивування і видового складу культури і можуть бути отримані в промислових кількостях. Передпосівна обробка насіння пшениці дозволяє збільшити вихід сухої біомаси кореневих екзометаболітів від 5,8 мг / 100 коренів в контролі до 7,5-8,0 мг / 100 коренів в експерименті. Як було показано раніше, такі кореневі екзометаболіти можуть володіти вираженим біологічним ефектом і можуть знайти застосування в біотехнології [50].

Необхідно відзначити, що в складі екзометаболітів водної культури пшениці була присутня невелика кількість мікроорганізмів, які росли тільки на універсальному живильному середовищі, а не росли на середовищі, до складу яких входили кореневі екзометаболіти. Передпосівна обробка насіння зменшувала інтенсивність росту цих мікроорганізмів, що дозволяє вважати, що вони присутні на поверхні зернівок, і не чинила будь-якого істотного «вкладу» в екскреторну систему кореня у водній культурі.

Отже, 1-3-добові проростки пшениці в водній культурі мають виражену екскреторну активність, але на кількість екскретуваних в середовище речовин і склад компонентів впливає передпосівна обробка насіння. Використовуючи різні способи передпосівної обробки насіння і збираючи екзометаболіти 1, 2 та 3 добових проростків пшениці можна отримувати різну їх кількість з різним складом.

Відомо, що склад кореневих екзометаболітів залежить від видового складу продуцентів. У зв'язку з цим були досліджені кореневі екзометаболіти гороху. Це обумовлено тим, що бобові насіння багаті білками, і можна



очікувати, що склад корневих екзометаболітів гороху буде відрізнятися від складу корневих екзометаболітів пшениці.

Супутні мікроорганізми не вносять будь-якого вагомого внеску в кількісний і якісний склад екзометаболітів водної культури 1, 2 та 3 добових проростків пшениці.

### **3. 1. 4 Вплив різних способів обробки насіння на схожість та інтенсивність росту кореня гороху**

На першому етапі роботи оцінювали вплив передпосівної обробки на інтенсивність проростання зерен гороху в водній культурі.

Було виявлено, що на 1 добу росту кількість непророслих зернівок було однаковим при всіх способах передпосівної обробки насіння (Табл. 3.3).

*Таблиця 3.3*

#### **Кількість насіння гороху, які непроросли (проросли) з 1 по 3 добу росту, % від загальної кількості**

Доба росту	Кількість насіння, які непроросли (проросли), %			
	Контроль	1-й сп-б (0,05% перманганату калію)	2-й сп-б (30 сек 70% спирт та 30 хв 5% гіпохлорит натрію)	3-й сп-б (5 хв 70% спирт та 40 хв 5% гіпохлорит натрію)
1-Добу росту	16,0±0,8 (84,0±0,8)	16,0±1,0 (84,0±1,0)	12,0±0,9 (88,0±0,9)	12,0±0,5 (88±0,5)
2-Добу росту	8,0±0,5 (92,0±0,5)	12,0±0,6 (88,0±0,6)	8,0±0,4 (92,0±0,8)	12±0,8 (88±0,8)
3-Добу росту	8,0±0,3* (92,0±0,3)	8,0 ±0,5* (92,0±0,5)	8,0±0,5* (92,0±0,5)	12±0,5 (88±0,5)

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

До 2 доби росту кількості непророслих зерен зменшувалася в контрольному варіанті, при 1-му та 2-му способах передпосівної обробки. До 3 доби воно було в 2 рази менше, ніж на 1 добу росту і становило 8 % від загальної кількості зерен (Табл. 3.3). При 3-му способі обробки насіння гороху кількість непророслих зерен гороху не змінювалася з 1 по 3 добу росту і становила 12 % від загальної кількості зерен у чашці Петрі. Слід зазначити, що при обробці насіння 70 % спиртом і 5 % гіпохлоритом натрію (3-й спосіб обробки) схожість насіння була в 1,5 нижче в порівнянні з контролем. Пригнічення схожості насіння при 3-му способі передпосівної обробки насіння з 1 по 3 добу росту може бути обумовлено різними причинами: загибеллю зародка насіння, порушенням системи поглинання насіння води, гальмуванням швидкості розвитку зародка насіння.

Довжина кореня в контрольному варіанті до 1 доби росту становила 0,58 см, до 2 доби збільшувалася в 1,6 раз, а до 3-ої доби в 3 рази в порівнянні з 1 добою росту (Рис. 3.6 А).

При 1-му та 2-му способі передпосівної обробки насіння довжина кореня гороху на 1-у добу росту не відрізнялася від контрольного варіанту. Довжина кореня на 2-у добу росту збільшувалася в 1,9 та 1,8 разів, а на 3 добу росту в 2,7 та 2,3 рази при 1-му та 2-му способі передпосівної обробки відповідно в порівнянні з 1 добою росту. При цьому достовірних відмінностей в довжині кореня в порівнянні з контрольним варіантом виявлено не було (Рис. 3.6).

Якщо представити ці дані в питомій швидкості росту коренів гороху при всіх способах передпосівної обробки насіння, то будуть виявлені відмінності в інтенсивності росту коренів насіння гороху з 1 по 3 добу росту.

Так, найбільшим приростом питомої швидкості росту коренів гороху контрольного варіанту було на 2 добу росту, а до 3 доби вона знижувалася як та для пшениці (Рис. 3.6). Для насіння гороху 1-го та 2-го способу передпосівної обробки характер інтенсивності росту коренів не відрізнявся від контрольного варіанту (Рис. 3.6А). Так, найбільший приріст питомої

швидкості росту коренів гороху відбувався за 1 добу росту, до 2 та 3 доби росту питома швидкість коренів гороху знижувалася як і для пшениці (Рис. 3.6).

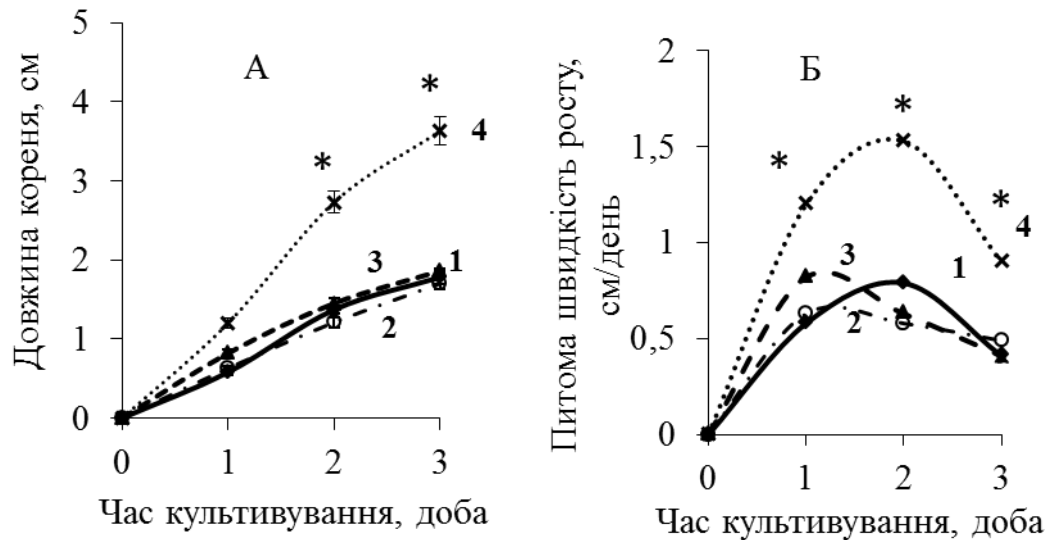


Рис 3.6 Довжина кореня проростків гороху (А) і питома швидкість їхнього росту (Б) з 1 по 3 добу росту в водній культурі в контрольному варіанті (1) та після передпосівної обробки: 1 сп - обробка перманганатом калію (2), 2 сп - етиловий спирт (30 сек.) і гіпохлорит натрію (30 хв.) (3); 3 сп - етиловим спиртом (5 хв.) та гіпохлоритом натрію (40 хв.) (4)

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

При 3-му способі передпосівної обробки насіння довжина кореня і питома швидкість росту коренів відрізнялися від всіх інших варіантів передпосівної обробки (Рис. 3.6).

Довжина кореня при 3-му способі обробки з 1 по 3 добу росту була в 2 рази більше, ніж в контрольному варіанті і при інших варіантах передпосівної обробки (Рис. 3.6).

Характер інтенсивності росту кореня з 1 по 3 добу росту збігався з контрольним варіантом, але при цьому питома швидкість росту коренів була вище на всіх етапах росту (Рис. 3.6).

Така стимуляція інтенсивності росту коренів короткострокової передпосівної обробкою насіння 70 % спиртом та 5 % гіпохлоритом натрію на фоні інгібування схожості насіння, як зазначалося для пшениці, викликана декількома причинами: 1- ефектом синхронізації клітинного циклу; 2- гормезісним ефектом; 3- змінами в співвідношенні між формуючою мікробіотою кореня і її впливу на інтенсивність росту.

Виходячи з отриманих даних, можна стверджувати, що передпосівна обробка насіння гороху впливала на довжину кореня гороху, а також на інтенсивність росту коренів з 1 по 3 добу росту та «чутливість» насіння гороху до компонентів передпосівної обробки відрізнялася від такої пшениці [47, 142].

### **3. 1. 5 Якісний та кількісний склад кореневих екзометаболітів після різних способів передпосівної обробки насіння гороху**

Як зазначалося, інтенсивність росту насіння залежить від кількісного і якісного складу мікроорганізмів, які формують кореневу ризосферу і забезпечують кореневе живлення рослин. Одними з основних компонентів мікрооточення кореня є вуглеводи, білки і вільні амінокислоти [147]. Так як, кореневі екзометаболіти здійснюють прямий і опосередкований (через регуляцію якісного і кількісного складу мікробіоти) вплив на інтенсивність росту коренів, то на наступному етапі роботи визначали якісний і кількісний склад кореневих екзометаболітів у разі різних способів передпосівної обробки насіння гороху.

Для цього визначали вміст загального білка, вільних амінокислот і загальних вуглеводів в водних КЕМ гороху з 1 по 3 добу росту при всіх способах передпосівної обробки.

Якщо уявити отримані дані за змістом загального білка, вільних амінокислот і загальних вуглеводів як загальна кількість екзометаболітів,

екскретіруемые корінням у будь-якому вигляді передпосівної обробки, то отримуємо наступні закономірності екскреції.

Загальний вміст КЕМ з 1 по 2 добу нічого не змінено і було однаковим у всіх варіантах обробки. До 3 доби росту екскреторна активність коренів збільшувалася тільки після 3-го способу передпосівної обробки (Рис.3.7).

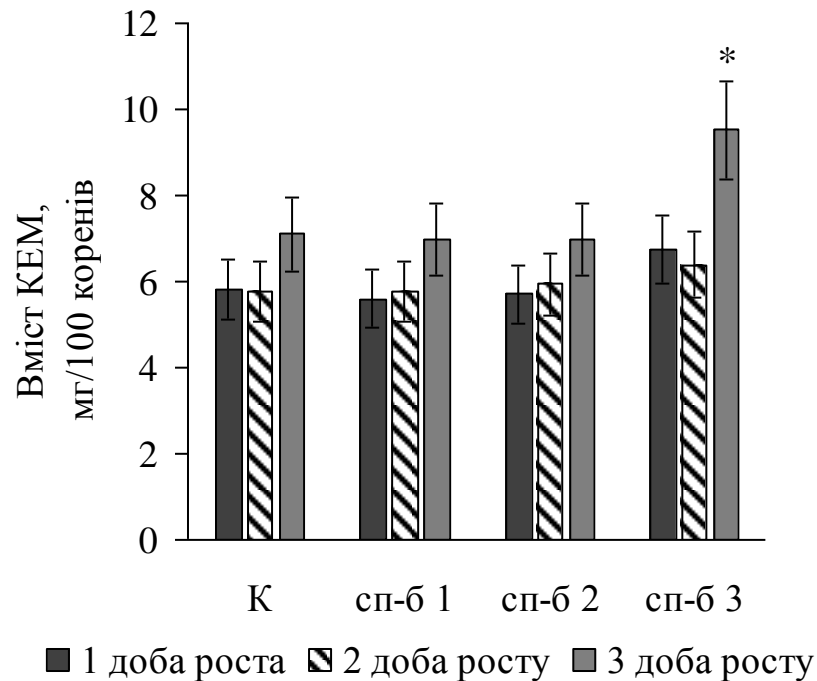


Рис. 3.7 Вміст загальної кількості корневих екзометаболітів у корневих екзометаболітів 1-, 2- та 3-добових проростків гороху після різної передпосівної обробки

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

Так, вміст загальних КЕМ на 3 добу росту в контрольному варіанті, при 1-му і 2-му способах обробки збільшувалася в середньому тільки на 22 %. Вміст загальних КЕМ на 3 добу росту при 3-му способі передпосівної обробки збільшувався на 41 % та був на 34 % вище, ніж в контрольному варіанті. Отже, 3-й спосіб передпосівної обробки насіння посилював швидкість виділення корневих екзометаболітів на 3 добу росту (Рис. 3.7).

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що передпосівна обробка насіння гороху також може бути використана для індукції екскреторної активності тільки після 3-го способу передпосівної обробки.

На наступному етапі роботи аналізували динаміку екскреції загальних білків, вільних амінокислот і загальних вуглеводів в складі КЕМ гороху при всіх способах передпосівної обробки насіння.

Вміст загальних білків у водних КЕМ на 1-у добу росту в середньому становив 4953,5 мкг / 100 зерен і було однаковим для всіх варіантів (Табл. 3.4).

*Таблиця 3.4*

**Вміст вуглеводів, загальних білків та амінокислот в корневих екзометаболітів 1-, 2- та 3-добових проростків гороху після різних способів передпосівної обробки насіння**

Вміст КЕМ	Доба росту	Контроль	Способи обробки		
			1-й спосіб	2-й спосіб	3-й спосіб
Білок, мкг / 100 зерен	1	4961,7±128,4	4687,3±177,9	4601,1±189,0	5565,1±235,3
	2	4716,3±233,3	4827,1±265,3	4782,2±217,9	5371,3±126,2
	3	5654,3±381,4	5460,2±447,8	5543,3±405,1	7546,3±398,3
Амінокислоти, мкг / 100 зерен	1	274,9±62,9	302,8±53,0	320,2±87,3	397,9±87,6
	2	337,0±68,5	227,9±38,0	313,61±44,11	24 ,2±55,5
	3	465,5±40,8	469,1±35,8	460,2±23,0	558,6±24,6
Вуглеводи, мкг / 100 зерен	1	597,1±32,2	610,2±38,2	776,5±32,7	780,7±59,9
	2	718,2±35,6	708,8±32,3	842,6±37,7	774,9±60,1
	3	975,9±58,8	1063,9±90,6	963,1±53,1	1412,8±86,3

У контрольному, 1-му та 2-му варіантах обробки насіння гороху вміст білка на 2 та 3 добу росту не змінювався і становив в середньому 5552 мкг /

100 зерен. У 3-му варіанті обробки вміст білка на 2 добу не змінювався, а на 3 доби збільшувався на 36 % в порівнянні з 1 добою росту. При цьому воно було на 34 % вище, ніж в контрольному варіанті (Табл. 3.4).

Динаміка екскреції загальних вуглеводів трохи відрізнялася від динаміки вмісту загальних білків в КЕМ гороху (Рис. 3.8). Так, вміст вуглеводів з 1 по 2 добу нічого не змінено, а до 3 доби збільшувалася у всіх варіантах передпосівної обробки (Рис. 3.8). При цьому кількість загальних вуглеводів в водних КЕМ гороху на 3 добу росту залежало від передпосівної обробки насіння гороху. У контрольному варіанті вміст вуглеводів до 3 доби росту збільшувалася на 63 %, при 1-му способі обробки - на 74 %, при 2-му способі - на 24 % і при 3-му способі - на 81 % в порівнянні з 1 добою росту (Табл. 3.4, Рис. 3.8).

Таким чином, передпосівна обробка насіння не мала значного впливу на вміст загального білка та вуглеводів в складі корневих екзометаболітів з 1-ої по 2-у добу росту. До 3-ої доби росту вміст даних компонентів в КЕМ гороху залежало від передпосівної обробки насіння гороху [26].

Динаміка екскреції вільних амінокислот в складі КЕМ гороху відрізнялася від динаміки екскреції білків і вуглеводів з 1 по 3 добу росту (Рис. 3.8).

У контрольному і в 2-му варіанті передпосівної обробки насіння гороху вмісту вільних амінокислот збігався (Рис. 3.8). Так, вміст амінокислот з 1 по 2 добу росту не змінювався, а до 3 доби збільшувався на 69 % та 44 % відповідно в порівнянні з 1 добою росту (Табл. 3.4).

Вміст амінокислот в 1-му та 3-му варіантах на 2 добу росту зменшувалася на 24 % та 38 % відповідно, а до 3-ї доби збільшувалася в 1,5 та 1,4 рази відповідно в порівнянні з 1 добою росту (Табл. 3.4).

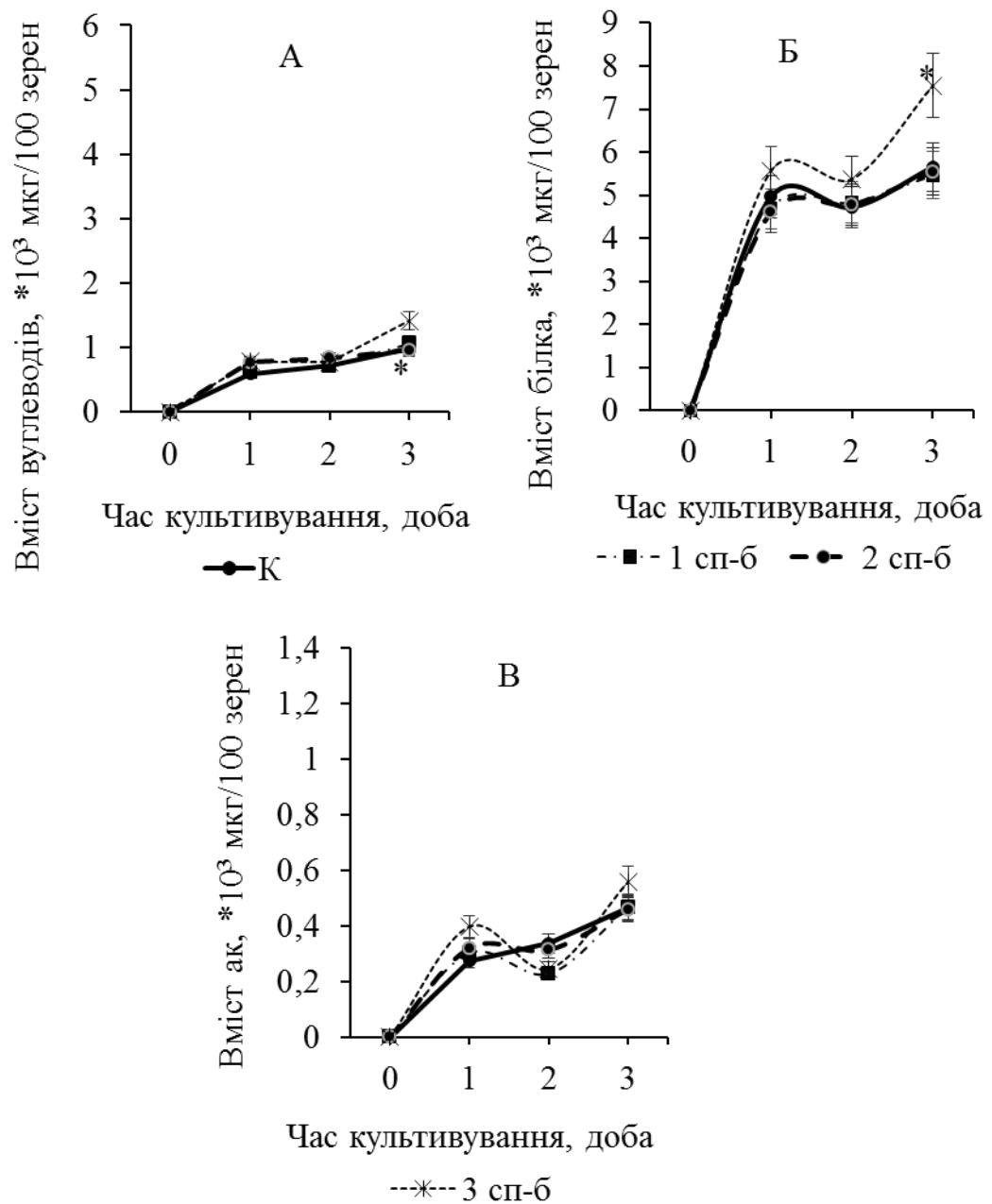


Рис. 3.8 Вміст вуглеводів (А), загальних білків (Б) та вільних амінокислот (В) в водних КЕМ гороху з 1 по 3 добу росту після різних способів передпосівної обробки насіння

Таким чином, передпосівна обробка насіння гороху впливала на вміст амінокислот у водних КЕМ гороху, а також на динаміку їх екскреції.



Слід зазначити, що співвідношення білків, амінокислот і загальних вуглеводів в складі КЕМ не змінювалось у 1, 2, та 3 добових КЕМ проростків гороху на відміну від складу КЕМ пшениці (Рис. 3.9, Рис. 3.4).

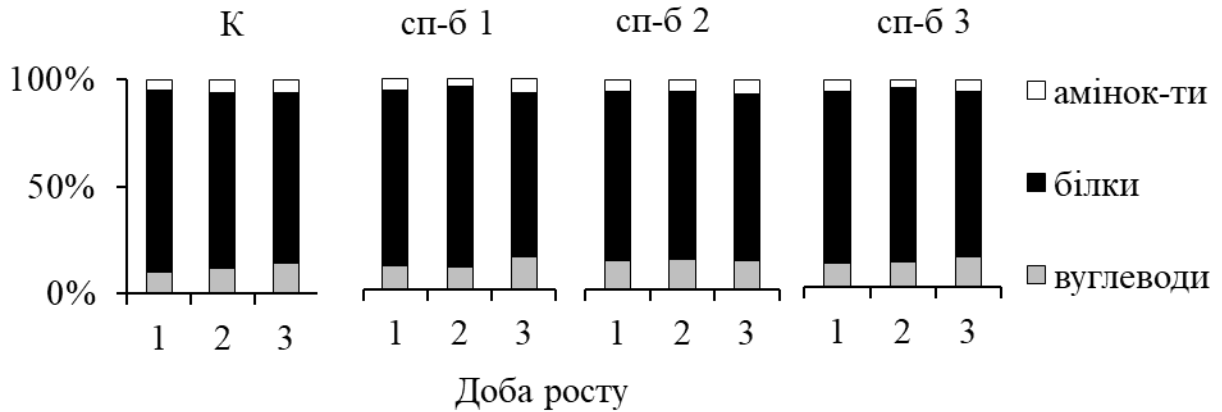


Рис. 3.9 Вміст вуглеводів, загального білка і вільних амінокислот в 1-, 2- та 3-добових корневих екзометаболітів гороху при різній передпосівній обробці

### 3. 1. 6 Вплив передпосівної обробки насіння на кількість мікроорганізмів у 2 добових проростків гороху у водній культурі

Було виявлено, що динаміка росту мікроорганізмів, виділених у 2-х добових проростків гороху після всіх способів передпосівної обробки, культивовані на м'ясо-пептонному агарі (МПА), мали різний характер.

Так при обробці зерен гороху контрольним і 3-м способом динаміка росту мікробіоти 2 добових КЕМ збігалися (Рис. 3.10). Для кривих росту мікробіоти було характерно наявність двох періодів росту культур мікроорганізмів: з 5 по 17 години росту та з 29 по 39 години культивування. При цьому до 17 години росту площа колоній становила 22000 ум. од, а до 39 години в 40000 умовних одиниць, тобто в 1,8 рази більше).

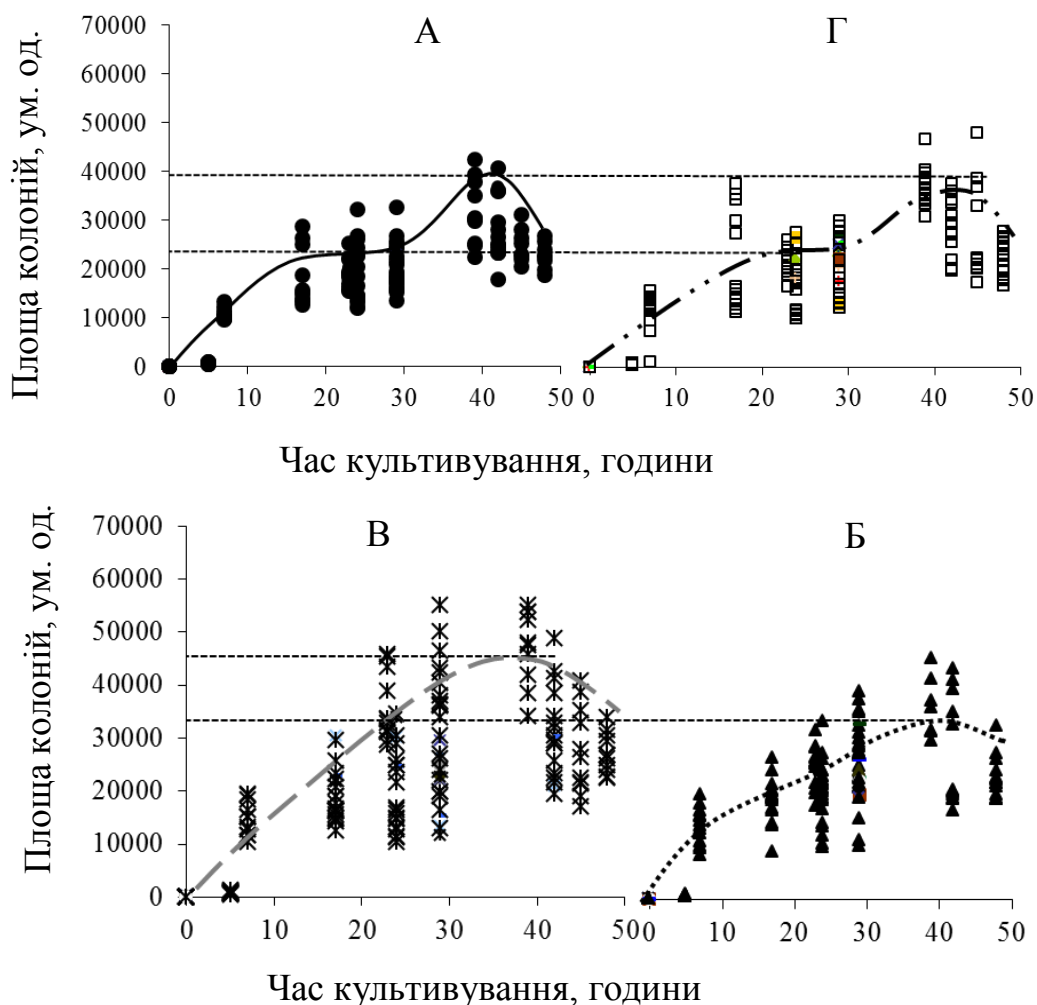


Рис. 3.10 Відносна площа колоній мікроорганізмів (умовні одиниці), виділених у 2-х добових проростків гороху після різної передпосівної обробки насіння і при культивуванні на агаризованому середовищі з м'ясо-пептонний агаром. А - контрольний варіант; Б – 1-й спосіб обробки, В – 2-й спосіб обробки, Г – 3-й спосіб обробки семян гороха

Такий характер динаміки росту може бути пов'язаний з тим, що в водних КЕМ гороху присутні кілька видів або родів мікроорганізмів, рост яких відбувається в різний час культивування. Стаціонарні фази росту спостерігали з 17 по 29 і з 39 по 45 години культивування (Рис. 3.10). Наявність двох стаціонарних фаз може бути пов'язано зі зміною домінуючого виду або роду мікроорганізмів в змішаній культурі бактерій.

При обробці зерен гороху 1-м і 2-м способами динаміки росту мала інший характер. Так, збільшення площі колоній мікроорганізмів спостерігали

до 39 годин росту на живильному середовищі. При цьому на 39 годині росту площа колоній мікробіоти КЕМ гороху, оброблених 2-м способом, було на 13000 ум. од. більше, ніж площа колоній мікробіоти КЕМ гороху, обробленого 1-м способом (Рис. 3.10). Тобто, швидкість росту мікроорганізмів КЕМ гороху розрізнялася. Можна припустити, що відрізнявся кількісний або якісний склад мікробіоти 2-х добових КЕМ гороху, оброблених 1-м і 2-м способами.

Слід зазначити, що різниця в характері динаміки росту мікробіоти КЕМ гороху, оброблених контрольним, 3-м способом і 1-м, 2-м способом, може свідчити про різний їх мікробіологічний склад. Тобто, можна говорити, що передпосівна обробка гороху впливає на склад мікробіоти 2 добових КЕМ гороху, бактерії яких здатні рости на твердому середовищі МПА.

### **3. 1. 7 Порівняння впливу передпосівної обробки на проростання і ріст коренів проростків пшениці та гороху**

Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що однотипна передпосівна обробка насіння гороху та пшениці по-різному впливала на схожість насіння і це може надавати різний вплив на інтенсивність росту коренів пшениці та гороху. Одним з важливих чинників росту рослин є функціональна активність кореневої системи, а точніше формування мікрооточення коренів. У процесі формування мікрооточення кореня визначальну роль відіграють кореневі екзометаболіти [2].

Найбільший ефект стимуляції як абсолютної (довжина кореня), так і питомої швидкості росту коренів пшениці спостерігали після 3-го способу передпосівної обробки насіння пшениці (Рис. 3.1А, В). Так, за абсолютною швидкістю росту на 3 добу вони перевершували контроль на 40 %, а по питомої швидкості росту на 36 % на 2 добу та на 98 % на 3 добу в порівнянні з контролем. Необхідно відзначити, що в контролі, після 1-го і після 2-го способів передпосівної обробки насіння питома швидкість росту на 3 добу

зменшувалася в порівнянні з 2 добою, а після 3-го способу обробки вона залишалася такою ж, як і на 2 добу росту (Рис. 3.1В).

У тому випадку, якщо передпосівній обробці піддавалися насіння гороху, то 1-й та 2-й способи передпосівної обробки насіння не впливали на інтенсивність росту коренів, в той час як 3-й спосіб обробки прискорював їх рост (Рис. 3.6). Так, довжина коренів перевершувала контроль на 106, 99 і 103 % на 1, 2, та 3 добу, відповідно (Рис. 3.6А). Питома швидкість росту також була значно вище контрольних значень (Рис. 3.6Б).

Отже: 1- передпосівна обробка насіння пшениці незначно прискорювала швидкість росту коренів, і цей ефект залежав від способу передпосівної обробки насіння; 2- передпосівна обробка насіння гороху надавала інший вплив на швидкість росту коренів: якщо 1-й та 2-й способи не впливали, то 3-й спосіб передпосівної обробки насіння в 2 рази збільшував швидкість росту коренів; 3- швидкість росту проростків з 1 по 3 добу була нелінійною: найбільша питома швидкості росту була на 2 добу росту, а на 3 добу вона знижувалася, що було характерно як для насіння пшениці, так і для насіння гороху.

Такий характер нелінійної динаміки росту проростків і висока варіабельність одержуваних результатів в біологічних експериментах відображає той факт, що біологічні системи - це нелінійні динамічні системи, для яких характерна «хаотичність» поведінки. Для характеристик таких систем використовують побудову динаміки поведінки системи в фазовому просторі. Графічне зображення поведінки системи в фазовому просторі отримало назву «аттракторів». Для аттрактора характерно компактне підмножина фазового простору динамічної системи, всі траєкторії з деякої околиці якої прагнуть до нього при часі, що прагне до нескінченності. Такі аттрактори відносяться до регулярних аттракторів. У тому випадку, якщо відсутня нерухома притягуюча точка, то такий аттрактор називається «дивним аттрактором» [113, 142, 180]. «Дивні аттрактори» володіть неперіодичною траєкторією, нестійким режимом функціонування і

характеризуються високою чутливістю до початкових умов. Площа дивного аттрактора, яка залежить від різноманітності траєкторій динаміки досліджуваних показників в фазовому просторі, відображає варіабельність (нестабільність) динаміки поведінки.

Форма аттрактора представлена «ядром» (темна область) і «хмарою» (світле штрихування), яке формується навколо ядра. Чим більшу площу займає «хмара», тим вище функціональна варіабельність показника, який досліджують.

«Ядро» аттрактора пов'язано з базальним стаціонарним рівнем, на основі якого формуються специфічні патерни варіабельності параметрів у відповідь на вплив різних чинників. Відхилення від «ядра» аттрактора пов'язано з компенсаторно-адаптивними перебудовами у відповідь на флуктуації зовнішнього середовища. Флуктуації аналізованого параметра, які зумовлені різними компенсаторно-адаптивними перебудовами, формують навколо «ядра» аттрактора «хмару».

Площа «дивного аттрактора», побудована за показниками довжини коренів пшениці, в контрольному варіанті з 1 по 3 добу росту збільшувалася: з 1 по 2 добу в 7 разів і в 3,5 рази з 2 по 3 добу росту (Рис. 3.11).

Передпосівна обробка насіння пшениці супроводжувалася збільшенням площі «дивного аттрактора» у 1 добових проростків в 2 рази в порівнянні з контролем незалежно від способу передпосівної обробки (Рис. 3.11). Однак, на 2 та 3 добу вони достовірно не відрізнялися від контролю (Рис. 3.11). Отже, варіабельність динаміки росту коренів пшениці багаторазово збільшувалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння пшениці збільшувала варіабельність динаміки росту тільки у 1 добових коренів пшениці і це не залежало від способу передпосівної обробки.

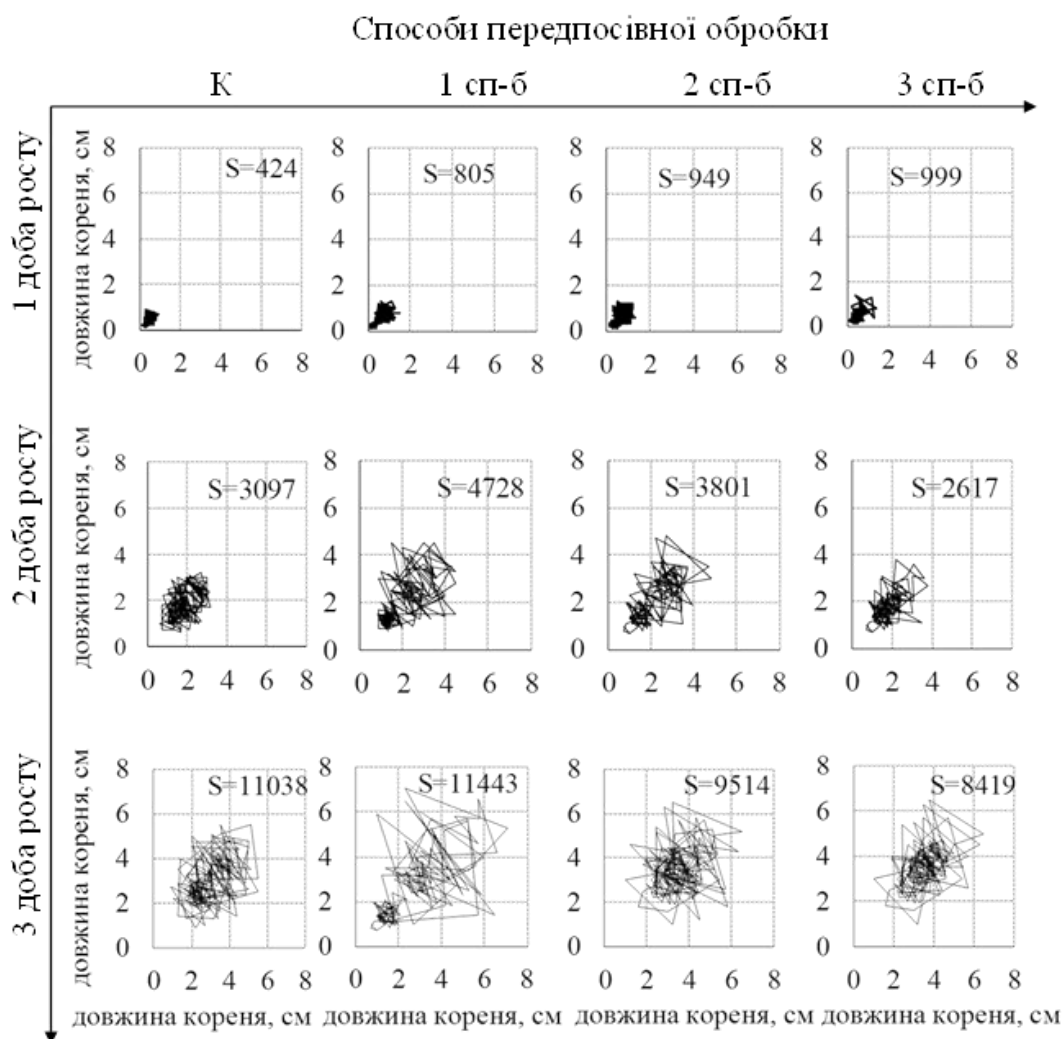


Рис. 3.11 Дивні атрактори для довжини кореня проростків пшениці з 1 по 3 добу росту. Зерна пшениці обробляли різними способами: К - контрольний варіант, 1 сп-б передпосівної обробки - перманганат калію, 2 сп-б - етиловий спирт (30 сек) та гіпохлорит натрію (30 хв); 3 сп-б - етиловий спирт (5 хв) та гіпохлорит натрію (40 хв)

«Дивні атрактори» для динаміки росту коренів гороху сильно відрізнялися від «дивних атракторів» пшениці (Рис. 3.12).

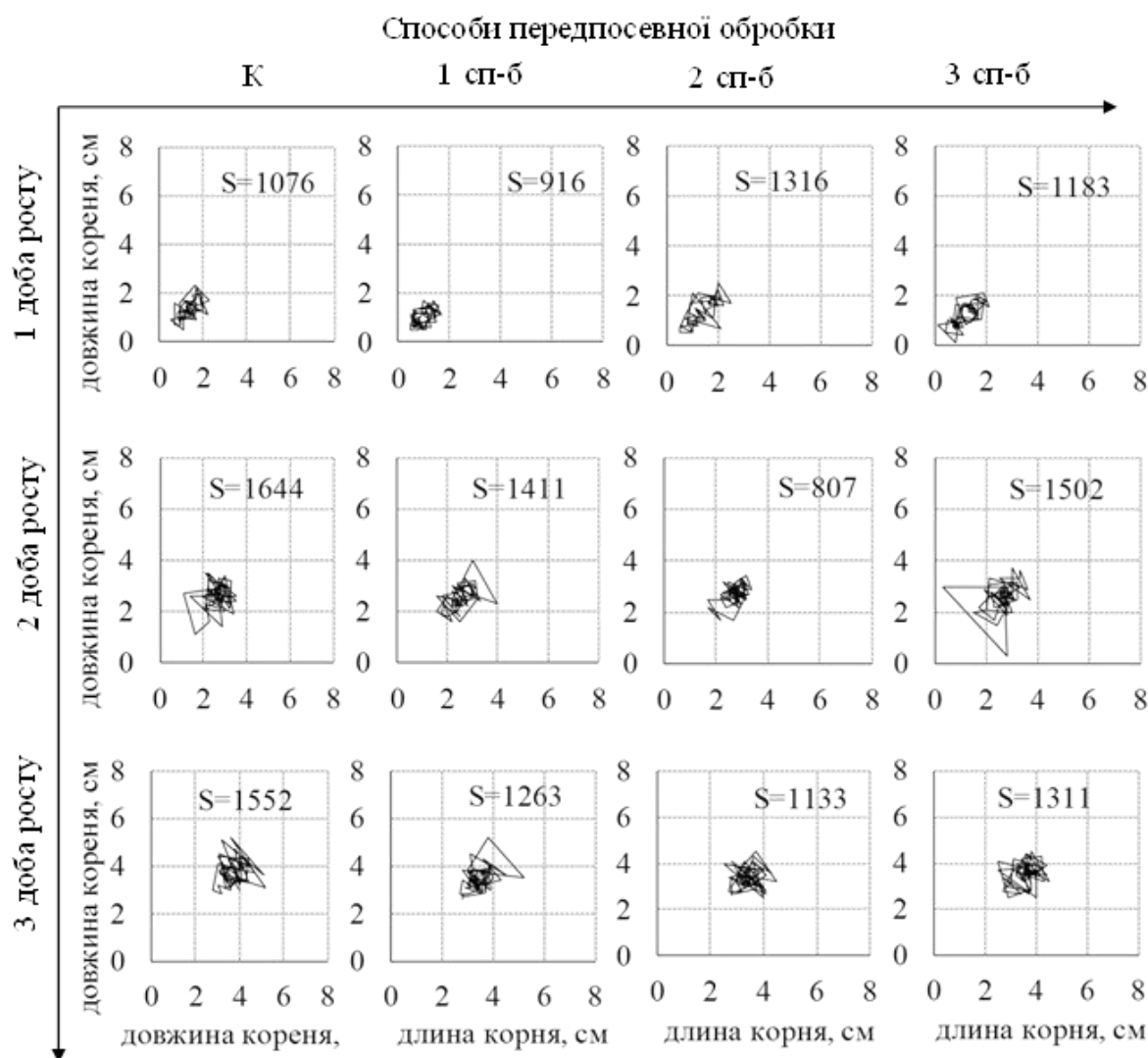


Рис. 3.12 Дивні атрактори для довжини кореня проростків пшениці з 1 або 3 добу росту. Зерна гороху обробляли різними способами: К - контрольний варіант, 1 сп-б передпосівної обробки - перманганат калію, 2 сп-б - етиловий спирт (30 сек) та гіпохлорит натрію (30 хв); 3 сп-б - етиловий спирт (5 хв) і гіпохлорит натрію (40 хв).

Так, для 1 добових коренів гороху площа «дивного атрактора» була в 2 рази більше таких пшениці. Площа атрактора достовірно не змінювалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння гороху не впливала на площу «дивних атракторів» на 2 та 3 добу росту (Рис. 3.12) [47].

Отже, використання «дивних атракторів» дозволяє виявити видові відмінності в нелінійній динаміці змін показників росту коренів і можуть

бути використані при оцінці варіабельності біологічних показників та має практичне значення.

### **3. 1. 8 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на характеристику прикордонних клітин**

Як відомо, в інтенсивності і характеристиці екскреторної активності кореня важливу роль відіграють прикордонні клітини кореня [114, 49]. Визначення кількості прикордонних клітин в ризосфері коренів пшениці та гороху показало, що у 1 добових коренів пшениці виявляється 80-100 клітин на корінь, в той час як у гороху їх кількість може варіювати від тисячі до кількох тисяч (Рис. 3.13) [142].

Необхідно відзначити, що прикордонні клітини кореня пшениці та гороху розрізнялися за розмірами і формою (Рис. 3.13Б). Отже, виявлені відмінності в кількісних і якісних відмінностях кореневих екзометаболітів можуть бути пов'язані з особливостями структурно-функціональної організації екскреторного апарату кореня у різних видів рослин.



Кількість прикордонних клітин на 1 добу роста, ПК/апекс	Пшениця	Горох
	89±20	1588±123
Морфологія прикордонних клітин		

Рис. 3.13 Кількість прикордонних клітин в ризосфері 1-добових коренів пшениці та гороху, морфологічні особливості цих клітин



Проростання насіння складний біохімічний процес, який може бути охарактеризований як перехід зі стану анабіозу до активного метаболізму. Цей ранній етап поділяють на 5 фаз: водопоглинання, набухання, ріст первинних корінців, розвиток паростка і становлення проростка. Стадії раннього етапу формування ростових процесів справляє визначальний вплив на подальший ріст і формування врожайності. Передпосівна обробка насіння, як правило, має забезпечувати підвищення схожості, енергії проростання і видалення фітопатогенів. Це актуально при отриманні корневих екзометаболітів у водних культурах в сучасних біотехнологіях [27, 152].

Видалення епіфітних мікроорганізмів досить складне завдання. Раніше було показано, що використана передпосівна обробка насіння може забезпечити часткове або повне видалення епіфітних мікроорганізмів [22]. Великий інтерес представляють дані по ефекту стимуляції інтенсивності росту проростків пшениці та гороху після послідовної обробки гіпохлоритом натрію та етиловим спиртом, тому що він впливає на якісні та кількісні характеристики екскреторної системи кореня. Різні ефекти впливу передпосівної обробки на насіння пшениці та гороху можуть пояснюватися відмінностями в структурі насіння і особливостями метаболізму клітин пшениці та гороху, що проявлялося в тому, що велика частина корневих екзометаболітів пшениці представлені вуглеводами, а гороху - білками. Отже, використовуючи пшеницю та горох можна отримувати біологічно активні сполуки різного складу з різною біологічною активністю.

Ефект стимуляції передпосівної обробки насіння може пояснюватися тим, що гіпохлорит натрію та етиловий спирт в використовуваних концентраціях і тимчасових інтервалах, надає незначні пошкодження поверхні насіння та, можливо, клітин зародка, що прискорює швидкість надходження води в тканини і збільшує поліферативну активність клітин як відповідь на незначні пошкодження клітинних компонентів, що і викликає гормезисний ефект. Подібний гормезисний ефект показаний після

опромінення різними видами радіації і дією інших фізичних факторів [68, 93, 97].

Таким чином, передпосівна обробка насіння пшениці та гороху гіпохлоритом натрію з наступною обробкою етиловим спиртом стимулює ріст проростків з 1 по 3 добу росту. Ефект стимуляції був різним для пшениці та гороху. Така стимуляція супроводжувалася посиленням екскреторною активністю кореневих екзометаболітів. Передпосівна обробка насіння пшениці супроводжувалася збільшенням варіабельності інтенсивності росту проростків і не впливала на цей показник на проростках гороху. Побудова дивних атракторів для нелінійних динамічних систем, якими є біологічні системи, можуть бути використані для характеристики росту проростків в екстремальних умовах.

### **3. 2 Вплив передпосівної обробки насіння пшениці та гороху на видовий склад епіфітних мікроорганізмів**

#### **3. 2. 1 Визначення мікробіоти на поверхні насіння пшениці та гороху після контрольного варіанту передпосівної обробки**

Для визначення бактерій, що ростуть на поверхні насіння пшениці після контрольного варіанту передпосівної обробки насіння, брали мазок з поверхні зернівки. Зразки культивували на рідкому універсальному живильному середовищі, після чого, пересаджували на тверду універсальну середу. У зразках контрольного варіанту пшениці, висаджених на універсальну насичену тверду живильну середу (кров'яний агар), виявляли два типи колоній, які розрізнялися за формою та кольором (Рис. 3.14). З цих колоній отримували чисті культури, які формували колонії неправильної форми. За допомогою середовища MacConkey і фарбування по Граму визначили, що ці бактерії є грамнегативними, паличкоподібними та рухливими. (Рис. 3.14) [22].

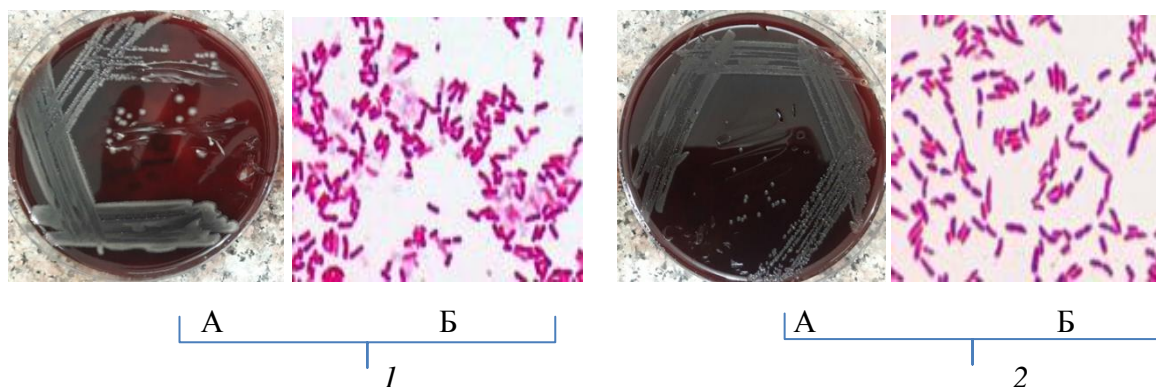


Рис. 3.14 Колонії бактерій, з поверхні насіння пшениці після контрольної обробки насіння, на blood agar (А), фарбування бактерій за Грамом (Б). 1 - перший вид колоній, 2 - другий вид колоній

У контрольному насінні гороху виявили чотири типи колоній мікроорганізмів розрізняються за кольором та формою, які імовірно відповідали *Klebsiella*, *Staphylococcus* та 2 видам паличковидних бактерій, імовірно роду *Bacillus*. Тільки один тип колоній був представлений грамнегативними бактеріями (Рис. 3.15).

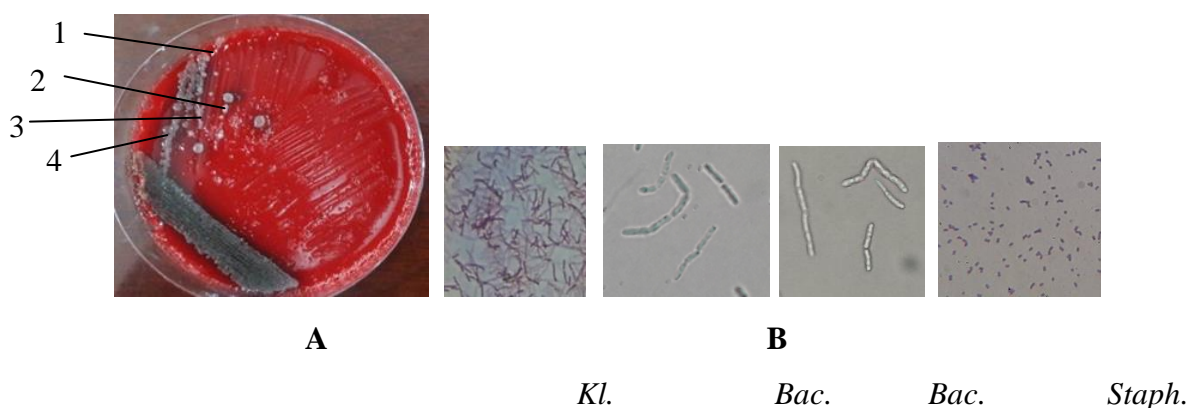


Рис. 3.15 Колонії бактерій, що ростуть на поверхні насіння гороху після контрольної обробки насіння, на кров'яному агарі (А) та фарбування за Грамом (Б).

На наступному етапі роботи було уточнено видовий склад грамнегативних мікроорганізмів, отриманих з поверхні пшениці та гороху. Для цього використовували тест (API).

Для контрольного насіння пшениці тест API показав відповідність бактерій до *Pantoea agglomerans* та *Pseudomonas fluorescens* або *Pseudomonas putida* (рис.3.16, Табл. 2.1).

Так як *Pantoea agglomerans* ферментує глюкозу (12), манітол (13), рамнозу (16), сахарозу (17), мелібіозу (18), амігдалін (19), арабінозу (20) і не ферментує інозитол (14), сорбітол (15) (Табл. 1). Ця бактерія не використовує цитрат як джерело вуглеводу (5) (CIT), синтезує уреазу (7), бета-галактозидаза (1), желатиназа (11), не виділяє H<sub>2</sub>S (6), indole (9), бета-галактозидаза (2), орнітиндекарбоксилаза (4), лізин-декарбоксилаза (3) (Рис. 3.16, Табл. 2.1).



Контрольна пластинка тесту API



*Pantoea agglomerans*



*Pseudomonas fluorescens*  
або *Pseudomonas putida*



*Klebsiella pneumoniae* або  
*Raoultella terrigena*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Рис. 3.16 Результати тесту API. 1-20 – номер та тип реакції вказано в Табл 2.1

*Pseudomonas* ферментує лише глюкозу (12), мелібіозу (18). Ця бактерія використовує цитрат як джерело вуглеводу (5) (CIT), синтезує уреазу (7), не

виділяє H<sub>2</sub>S (6), бета-галактозидазу (1), желатінозу (11), аргінін дігідролазу (2), орнітиндекарбоксилазу (4) (Рис. 3.16, Табл. 2.1).

За допомогою API тесту (позитивні реакції тесту) ідентифіковані бактерії, які були виділені з поверхні насіння гороху контрольного варіанту: *Klebsiella pneumoniae* або *Raoultella terrigena* (Рис. 3.16), так як вони ферментують усі види вуглеводів (12-20), які присутні в тест-зразку (Рис. 3.16, Табл. 2.1). Ці бактерії не синтезують бета-галактозидазу (1), аргінін дігідролазу (2), орнітиндекарбоксилазу (4), желатіназу (11), індол (9), H<sub>2</sub>S (6), а використовують цитрат як джерело вуглеводу (5) (CIT), виділяють уреазу (7) (Табл. 2.1).

Для уточнення видового складу епіфітних мікроорганізмів виділяли ДНК мікроорганізмів, проводили гель електрофорез, ПЛР та визначали розмір отриманих фрагментів генів 16S р РНК. Гени 16S р РНК у всіх отриманих мікроорганізмів мали 1250 пар основ (Рис. 3.17).

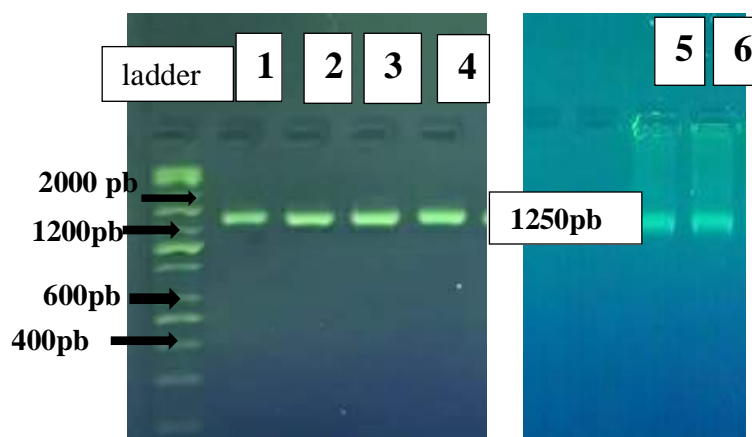


Рис.3.17 Продукт ПЛР - розмір гену рРНК, що складається з 1250 пар основ (pb). Поділ проводили в 2% агарозе при 5 вольт / см<sup>2</sup>. 1х ТВЕ буфер на 1:30 годин. N: маркери фрагментів ДНК (100 мкл). 1,2,3,4 зразки ДНК, виділених з колоній бактерій, отриманих з поверхні насіння гороху. 5,6 - зразки бактерій з поверхні насіння пшениці

В результаті секвенування та порівняльного аналізу за допомогою програм (BLAST) виявили відповідності для пшениці з *Pantoea agglomerans* strain C410P1 та *Pseudomonas fluorescens* strain SBW25, а для гороху відповідно: *Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ33.

Отже, епіфітні мікроорганізми насіння пшениці після промивання проточною і стерильною дистильованою водою були представлені 2 видами бактерій (*Pantoea agglomerans* та *Pseudomonas fluorescens*), а насіння гороху 4-ма основними видами (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus* та *Staphylococcus pasteurii*), два з яких є патогенними для людини та тварин.

### **3. 2. 2 Вплив передпосівної обробки насіння розчином перманганату калію, етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію на видовий склад мікроорганізмів на поверхні насіння пшениці та гороху**

Було виявлено, що передпосівна обробка насіння пшениці перманганатом калію не чинила впливу на видовий склад бактерій, які присутні на поверхні зернівки пшениці (Рис. 3.18 А, Б, Табл. 3.5).

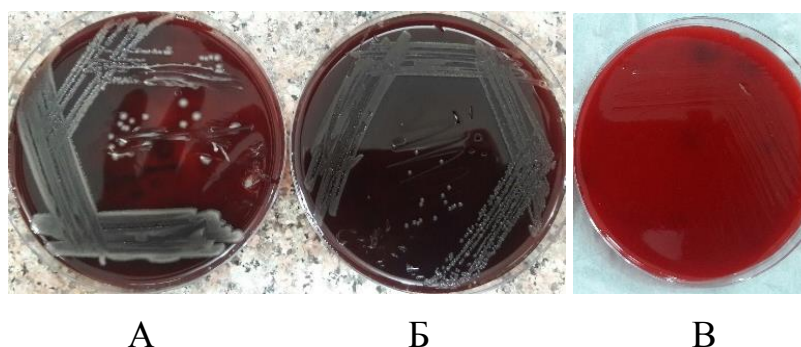
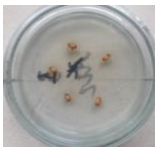


Рис. 3.18 Колонії бактерій, отримані з поверхні насіння пшениці після контрольного і першого способу обробки перманганатом калію (А, Б) та другого способу обробки - етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію (В)

Однак другий спосіб обробки насіння пшениці (етиловий спирт та гіпохлорит натрію) видаляв обидва види бактерій, про що свідчить відсутність росту бактерій на універсальному живильному середовищі (blood agar) (Рис. 3.18С, Табл. 3.5) [22].

Таблиця 3.5

**Присутність бактерій на поверхні насіння пшениці та гороху після різних способів передпосівної обробки насіння**

Вид насіння	Рід бактерій		
	Контроль (проточна вода)	1-й спосіб обробки (перманганат калію)	2-й спосіб обробки (етиловий спирт, гіпохлорит натрію)
Пшениця	<i>Pantoea agglomerans</i> strain C410P1.	<i>Pantoea agglomerans</i> strain C410P1.	Не було виявлено колонії бактерій 
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain SBW25.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain SBW25.	
Горох	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain VB-1.5.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain VB-1.5	---
	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.	<i>Bacillus safensis</i> strain 18.
	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006.	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006	<i>Bacillus pumilus</i> strain G006.
	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain SMJ3	---	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain SMJ33

Після обробки насіння гороху перманганатом калію з поверхні насіння вибірково віддалялися *Staphylococcus pasteurii* і виявлялися тільки 3 види



бактерій (*Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006) (Табл. 3.5).

Передпосівна обробка насіння гороху етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію приводила до видалення тільки *Klebsiella pneumoniae* (Табл. 3.5).

Отже, передпосівна обробка насіння пшениці та гороху однотипними способами забезпечувала різну ефективність знезараження насіння [22]. Мікроорганізми, що знаходяться на поверхні насіння гороху, мають більш «міцний зв'язок» з поверхні ніж у пшениці. Для насіння пшениці обробка етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію забезпечує знезараження насіння. У той же час поєднання різних способів передпосівної обробки насіння гороху (перманганат калію, етиловий спирт та гіпохлорит натрію) забезпечує видалення патогенних мікроорганізмів (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus pasteurii*), при цьому *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus* залишалися на поверхні насіння гороху.

У процесі життєдіяльності вищі рослини активно взаємодіють з мікроорганізмами. Характер цих взаємовпливів дуже різноманітний від симбіотичного до патогенного. Існує думка, що вищі рослини формують з мікроорганізмами єдину функціональну систему - голобіонт, яка є одиницею еволюційного відбору [4, 95]. Найбільш тісна і важлива для забезпечення життєдіяльності holobionta є ризосфера. Перша згадка про ризосферу зустрічається в 1904 році у Гільтпера, який виявив підвищений вміст мікроорганізмів в прикореневій зоні та висловив припущення про їх вплив на ріст рослин. Сьогодні відомо, що основною ланкою або субстратом взаємодій між рослиною і мікроорганізмами є кореневі екзометаболіти. Показано, що від 30 до 50 % продуктів фотосинтезу виділяються корінням в середу як метаболіти [266], вони є місцем існування мікроорганізмів, які в свою чергу забезпечують рослини стимуляторами росту та «витісняють патогенні для рослин мікроорганізми». Кореневі екзометаболіти представлені широким спектром біологічно активних речовин і представляють великий інтерес для



фармацевтичної біотехнології [221]. В даний час активно розробляються способи отримання корневих екзометаболітів у гідропонних або водних культурах і контроль за кореневої мікробіотою є важливим завданням таких технологій. На склад кореневої мікробіоти велику, а можливо, і основну роль грають епіфітні мікроорганізми. Разом з тим, роль епіфітна мікрофлори, яка досить різноманітна, в процесах формування ризосфери остаточно не встановлена, вона може впливати і на екскреторну активність кореня. Видалення епіфітних мікроорганізмів є складною і практично важливим завданням.

В роботі було показано, що епіфітом пшениці та гороху різний як за видовим складом, так і по міцності «утримання» або ефективності видалення з поверхні насіння. Про механізми формування контактів мікроорганізмів з сухим насінням відомо мало. Можна вважати, що в залежності від характеристик оболонки насіння, оводненості насіння, строків зберігання та видового складу мікроорганізмів ці контакти будуть різними [206]. В даний час видовий склад епіфітома використовується при оцінці термінів і умов зберігання насіння [101]. Виявилося, що послідовна обробка насіння пшениці етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію (2-ий спосіб передпосівної обробки) дозволяє отримати насіння пшениці без мікроорганізмів, але не гороху. Видалення мікроорганізмів з поверхні насіння пшениці супроводжувалося невеликим ефектом пригнічення схожості насіння, при цьому питома швидкість росту залишившогося насіння перевершувала контрольний варіант на 32 % на 2-3 добу росту.

Отримані результати пояснюються подвійним ефектом передпосівної обробки насіння. По-перше, частина насіння втрачала схожість після обробки, по-друге, для зберіглих схожість насіння проявлявся гормезисний ефект - стимулюючий ефект малими дозами токсикантів. Гормезисний ефект показаний на різних тваринних та рослинних об'єктах і після дії різних «токсикантів» (радіації, іонів важких металів та інших хімічних сполук) [66, 69].

Дослідження механізмів гормезісного ефекту у тварин стало підставою навіть для розробки нового класу лікарських препаратів, названих герметінами [93].

Важливо відзначити, що ефект гормезису у пшениці не пригнічував, а навіть збільшував інтенсивність екскреції корневих екзометаболітів на 17-21% на 3 добу культивування в порівнянні з контрольним варіантом (Рис. 3.7). Необхідно відзначити, що і обробка насіння пшениці перманганатом калію, яка не забезпечувала видалення епіфітних мікроорганізмів і в меншій мірі стимулювала рост проростків і також надавала стимулюючий ефект на екскреторну активність кореня (Рис. 3.18, Табл. 3.5).

На користь висловлених положень можуть свідчити і результати, отримані на насінні гороху. Так, передпосівна обробка насіння гороху (1-ий та 2-ий способи) не забезпечувала видалення всіх мікроорганізмів з поверхні насіння, не впливала на схожість насіння та інтенсивність росту проростків, при цьому екскреторна активність коренів залишалася на рівні контролю (Рис. 3.6, 3.7).

Разом з тим, два різні способи передпосівної обробки насіння гороху дозволяють видалити патогенні штами бактерій (*Klebsiella*, *Staphylococcus*).

Тобто, передпосівна обробка насіння пшениці послідовною обробкою етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію може бути рекомендована при отриманні корневих екзометаболітів пшениці, а послідовна обробка гороху рекомендована для видалення у них патогенних мікроорганізмів (Рис. 3.19).

Така вибіркковість пояснюється різною чутливістю *Klebsiella* та *Staphylococcus* до перманганату калію, спирту та гіпохлориту натрію.

Антибактеріальний ефект перманганату калію показаний на тваринах [5, 82]. Він здатний проникати через захисний мультиполісахаридний шар клітин бактерій, зокрема *Staphylococcus* і пригнічувати їх життєдіяльність. Отримані результати підтверджують його антибактеріальні властивості і на насінні рослин.



Рис. 3.19 Етапи отримання корневих екзометаболітів та проростків пшениці та гороху після видалення епіфітних мікроорганізмів, що виявляють патогенні властивості

Другий метод передпосівної обробки насіння, який включає етаноловий спирт 70 % та гідрохлорид натрію 5 %, інгібував ріст грамнегативних бактерій на поверхні насіння пшениці та гороху, що можна пояснити присутністю спирту в цій обробці і його вплив на стінку негативних бактерій, яка є менш товстою, ніж стінка позитивних бактерій забарвлення по Граму. Крім того, клітинна стінка у грамнегативних бактеріях має високий вміст ліпідів - 11-22 % від сухої маси клітинної стінки, в той час як в стінці грампозитивних бактерій їх близько 3 %. Такий високий відсоток ліпідів дозволяє етанолу на 70 % з більшою ймовірністю видалити ліпіди з клітинної стінки і, таким чином, призводить до осмосу клітин і, отже, загибелі бактеріальних клітин.

Крім того, дослідження показують, що грампозитивні бактерії проявляють більшу стійкість, ніж грамнегативні бактерії, до з'єднань, що

містить хлор [263]. Це означає, що грамнегативні бактерії більш чутливі до цих сполук. У деяких дослідженнях також висловлено припущення, що хлорид натрію є інгибіруючим з'єднанням завдяки своїй здатності викликати порушення бактеріальних мембран. Рівень інфікування у грамнегативних бактерій часто вище, ніж у грампозитивних бактерій, оскільки шар пептидоглікану у грампозитивних бактерій товщій, ніж у грамнегативних бактерій.

### **3. 3 Оцінка біологічної активності корневих екзометаболітів**

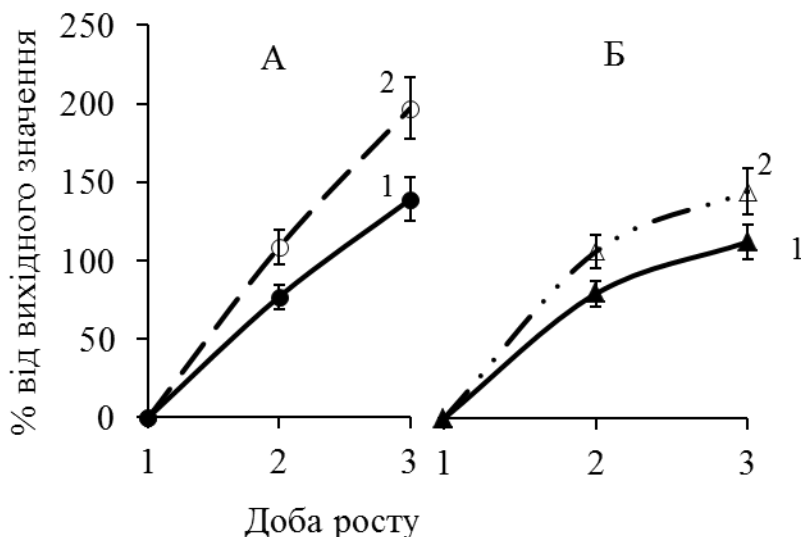
#### **3. 3. 1 Вплив корневих екзометаболітів гороху на інтенсивність росту коренів пшениці та екзометаболітів пшениці на інтенсивність росту гороху**

Як відомо, алелопатія – це вплив корневих екзометаболітів на інші види рослин. Характер такого впливу може бути негативним, стимулюючим або нейтральним. Кореневі екзометаболіти можуть мати прямий вплив на ріст і розвиток інших видів рослин, виконуючи функції регуляторів росту, так і опосередкований шляхом рекрутування мікроорганізмів в ризосферу, а вони в свою чергу впливають на ріст і розвиток рослин. Дослідження механізмів алелопатичних взаємодій досить складне і в той же час важливе завдання, так як кореневі екзометаболіти можуть бути використані на практиці. У зв'язку з цим, на наступному етапі роботи визначали вплив корневих екзометаболітів гороху на інтенсивність росту коренів пшениці і навпаки, екзометаболітів пшениці на ріст коренів гороху.

У даній серії експериментів зерна пшениці та гороху обробляли контрольним, 1-м та 2-м способами передпосівної обробки.

Внесення корневих екзометаболітів гороху, отриманих у 1 добових коренів в культуру 1 добових проростків пшениці прискорювали рост коренів пшениці на 31 % в порівнянні з контролем, а через 3 доби навіть на

58 % (Рис. 3.20). Внесення екзометаболітів пшениці, отриманих у 1 добових коренів пшениці до 1 добовим проросткам гороху, також чинило стимулюючий ефект на ріст коренів, проте він був виражений в меншій мірі, ніж вплив екзометаболітів гороху на корені пшениці (Рис. 3.20).



1- контроль без внесення КЕМ; 2- після внесення КЕМ

Рис. 3.20 Вплив корневих екзометаболітів гороху (1-добові) на інтенсивність росту коренів пшениці (А) та корневих екзометаболітів пшениці (1-добових) на інтенсивність росту коренів гороху (Б)

Той факт, що внесення корневих екзометаболітів гороху в середовище культивування проростків пшениці стимулювало ріст коренів пшениці становить інтерес у розумінні регуляції проліферативної активності кореневої меристеми. Ми вважаємо, що ефект стимуляції може реалізовуватися за кількома механізмами в результаті прямого впливу екзогенних сполук на клітини меристеми і в результаті непрямого впливу екзометаболітів на мікробіоту ризосфери кореня і як наслідок посилення проліферативної активності меристеми кореня.

### 3. 3. 2 Результати використання КЕМ як поживних середовищ для культивування мікроорганізмів

Сучасна мікробіологія та біотехнологія займається культивуванням та отриманням біомаси бактерій. Для їх культивування необхідні дешеві універсальні поживні середовища. Останнім часом активно розвивається такий напрямок в біотехнології як кореневі технології, засновані на отриманні та вивченні біологічної активності корневих екзометаболітів різних рослин і їх використанні. Відомо, що кореневі екзометаболіти (КЕМ) впливають на рост мікроорганізмів в ризосфері, можуть мати антиоксидантну та антирадикальну активність [98, 272]. Отже, кореневі екзометаболіти рослин, що володіють різною біологічною активністю, можуть бути перспективними при використанні їх в якості поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, які використовуються в біотехнології, медицині та фармації.

Було виявлено, що КЕМ пшениці та гороху в порівнянні з МПА інгібували рост бактерії *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*.

Так, бактерії *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* не росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і гороху (Рис. 3.21).

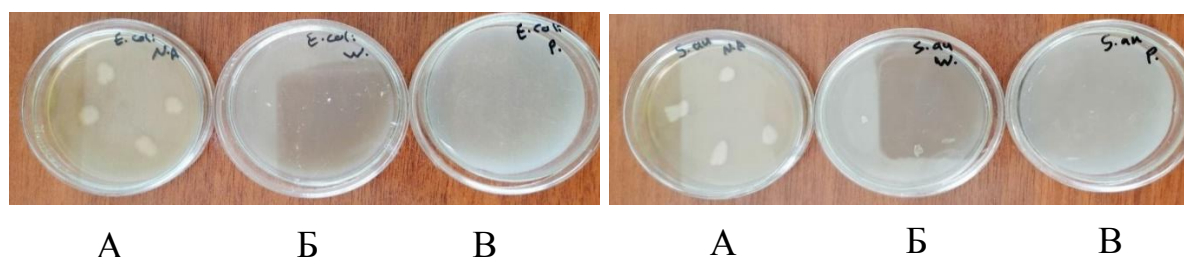


Рис. 3.21 Колонії *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* на щільних середовищах, що містять м'ясо-пептонний агар (А), кореневі екзометаболіти пшениці (Б), отримані у 2-добових коренів та кореневі екзометаболіти гороху (В), отримані у 2-добових коренів

Бактерії *Klebsiella pneumoniae* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці і не росли на чашках Петрі, що містять КЕМ гороху. Слід зазначити, що площа колоній *Klebsiella pneumoniae* на МПА була більша за площу їх колоній, що ростуть на КЕМ пшениці (Рис. 3.22).



А

Б

В

Рис. 3.22 Колонії *Klebsiella pneumoniae* на щільних середовищах, що містять м'ясо-пептонний агар (А), кореневі екзометаболіти пшениці (Б), отримані у 2-добових коренів та кореневі екзометаболіти гороху (В), отримані у 2-добових коренів

Різний склад екзометаболітів проростків пшениці та гороху може надавати різний вплив на інтенсивність росту мікроорганізмів ризосфери і таким чином впливати на інтенсивність росту коренів і формувати відмінності в аллелопатичних взаєминах цих видів рослин [25]. Виходячи з цього, визначали здатність мікроорганізмів *Bacillus cereus* рости на екзометаболітах пшениці та гороху. В якості контрольного середовища використовували стандартну середу (м'ясо-пептонний агар, МПА).

Рост ґрунтових мікроорганізмів роду *Bacillus* на поживних середовищах на основі КЕМ залежав від виду мікроорганізмів.

Бактерії *Bacillus licheniformis* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці та гороху. При цьому колонії *Bacillus licheniformis* на чашках Петрі з КЕМ пшениці були виявлені тільки на 24 годину росту, а на КЕМ гороху - на 48 годину росту (Рис. 3.23).

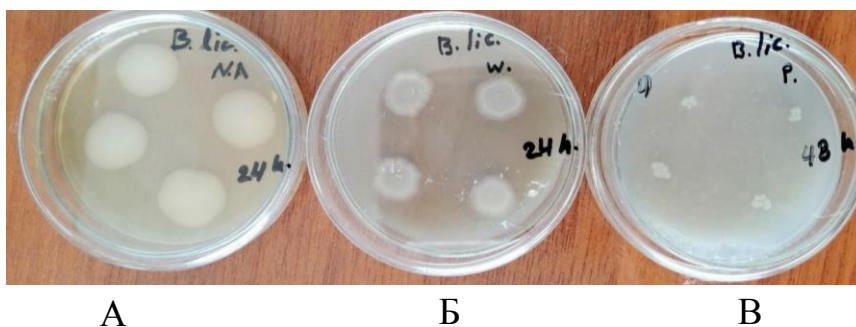


Рис. 3.23 Колонії *Bacillus licheniformis* через 48 годин культивування на щільних середовищах, що містять м'ясо-пептонний агар (А), кореневі екзометаболіти пшениці (Б), отримані у 2-добових коренів та кореневі екзометаболіти гороху (В), отримані у 2-добових коренів

Бактерії *Bacillus popilliae* росли на чашках Петрі, що містять КЕМ пшениці та гороху (Рис. 3.24).

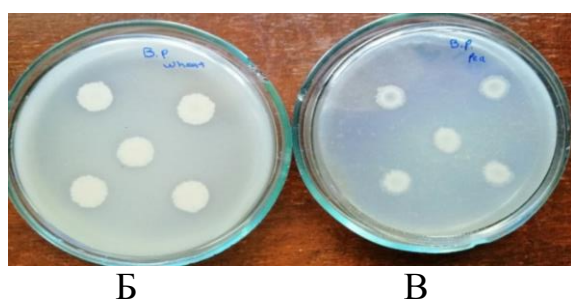


Рис. 3.24 Колонії *Bacillus popilliae* на щільних середовищах, що містять кореневі екзометаболіти пшениці (Б), отримані у 2-добових коренів та кореневі екзометаболіти гороху (В), отримані у 2-добових коренів

Було виявлено, що бактерії *Bacillus cereus*. на універсальному середовищі МПА утворював виражені округлі колонії білого кольору. Площа колоній становила 2643,7 ум. од. (Рис. 3.25 А).



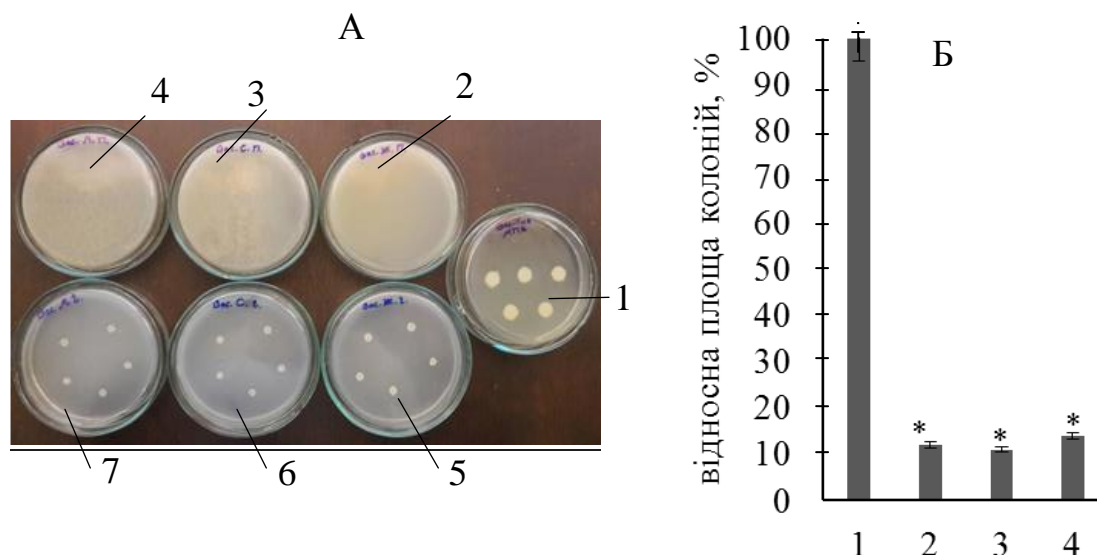


Рис. 3.25 Колонії *Bacillus cereus* на щільних середовищах (А), що містять м'ясо-пептонний агар (1), кореневі екзометаболіти пшениці (2, 3, 4), отримані у 2-добових коренів, та кореневі екзометаболіти гороху (5, 6, 7), отримані у 2 добових коренів. Відносна площа колоній *Bacillus cer.* (Б) відповідно на МПА (1), на кореневих екзометаболітах гороху, отриманих без передпосівної обробки (2), після 1-го способу обробки (3) та після 2-го способу передпосівної обробки (4)

У тому випадку, якщо *Bacillus cereus* культивували на екзометаболітах пшениці, ріст бактерій був відсутній, тобто вони не здатні засвоювати екзометаболіти пшениці (Рис. 3.25А). Якщо *Bacillus cereus* культивували на екзометаболітах гороху, то бактерії утворювали такі ж білі, округлі колонії, як і на МПА (Рис. 3.25А) [27].

Ці результати побічно підтверджують відмінність складу кореневих екзометаболітів пшениці та гороху і вказують, що кореневі екзометаболіти можна використовувати як селективні середовища.

Для оцінки інтенсивності росту бактеріальної культури визначали площу колоній. Виявили, що площа колоній *Bacillus cereus*. не залежить від способу передпосівної обробки насіння і була на 70-80 % менше площі колоній при рості на МПА (Рис. 3.25В).

Отже, екзометаболіти пшениці та гороху розрізняються по біологічній активності, принаймні щодо досліджених видів бактерій, можна вважати, що екзометаболіти здатні виявляти селективність до різних біологічних систем та знайти застосування в біотехнології.

Можна говорити, що КЕМ пшениці та гороху можуть бути використані в якості поживних середовищ для культивування певних видів бактерій. Відсутність або інгібування росту цих бактерій на живильних середовищах на основі КЕМ пшениці або гороху може бути пов'язана з: 1- нездатністю цих бактерій поглинати речовини, що містяться в КЕМ пшениці та гороху; 2- відсутністю або малою кількістю речовин в КЕМ, необхідних для росту бактерій; 3- наявністю в КЕМ речовин, що пригнічують ріст цих бактерій.

### **3. 3. 3 Використання впливу деяких представників ризосферних мікроорганізмів на ріст проростків пшениці та гороху при різних способах передпосівної обробки насіння**

Як було показано, передпосівна обробка насіння як пшениці, так і гороху впливає на інтенсивність росту проростків, на склад корневих екзометаболітів та склад ризосферної мікрофлори (Рис 3.19). Ці результати вказують на те, що зростаючий корінь формує авторегулюючу систему, яка складається з власних клітин кореня, ризосфери, до складу якої входять прикордонні клітини кореня, кореневі екзометаболіти і мікроорганізми, які можуть дати представлені як ендогенної та екзогенної мікрофлорою. Дослідження авторегуляції в системі «корінь-мікрооточення» представляє великий теоретичний і практичний інтерес. У зв'язку з цим досліджували вплив екзогенних мікроорганізмів ризосфери на інтенсивність росту проростків на початкових стадіях росту. Для цього в культуру 1 добових проростків пшениці або гороху вносили культури двох мікроорганізмів *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae* і визначали інтенсивність росту проростків.

Виявилося, що, якщо в контрольному варіанті інтенсивність росту коренів пшениці була майже лінійною з 1 по 3 добу росту (Рис. 3.26А), то внесення в середу культивування *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae* зупиняло рост проростків на рівні 1 доби (Рис. 3.26А).

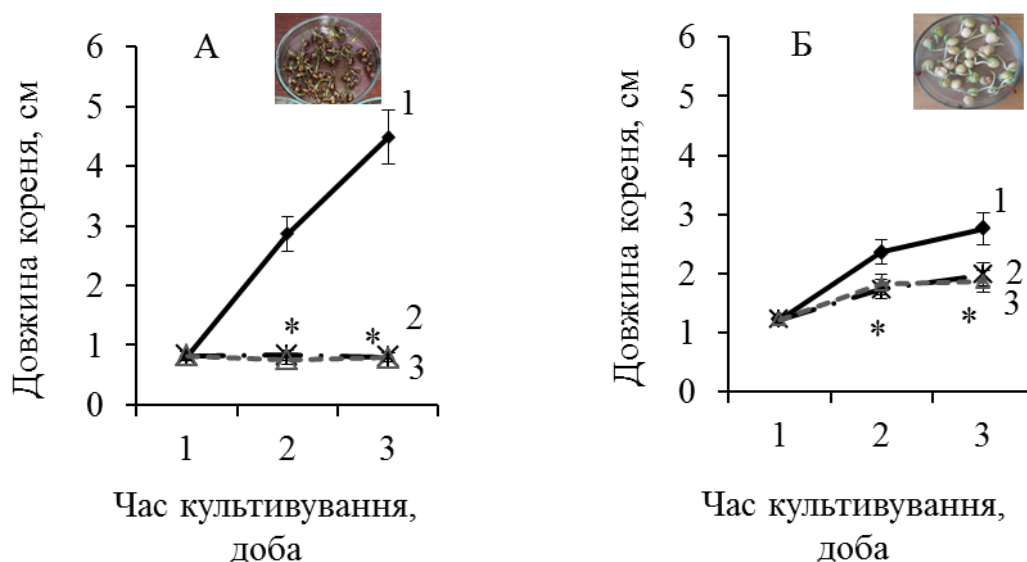


Рис. 3.26 Довжина кореня проростків пшениці (А) та гороху (Б) після внесення культур мікроорганізмів *Bacillus cereus* (2) *Bacillus popilliae* (3), 1- культуру проростків вносили дистильовану стерильну воду

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

У тому випадку, якщо мікроорганізми вносили в культуру гороху, то вони теж впливали на ріст проростків, проте не угнітали його, як у випадку з проростками пшениці, а призупиняли їх ріст (Рис. 3.26Б). Такий ефект не залежав від виду *Bacillus*.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що: 1- зміна складу мікробіоти ризосфери надає регуляторний вплив на метаболізм кореня; 2- мають місце видові відмінності впливу мікрооточення, коріння пшениці володіло більшою чутливістю до негативного впливу *B. cereus* та *B. popilliae*.

Досліджували вплив передпосівної обробки насіння на стійкість проростків пшениці та гороху до дії *B. cereus* та *B. popilliae*. Виявилося, що передпосівна обробка насіння різними способами (1 - 0,5% розчином

перманганату калію, 2 - 30 сек. 70 % спирт та 30 хв. 5 % гіпохлорит натрію) не чинила вплив на інгібуючу дію екзогенних культур *Bacillus* як для проростків пшениці, так і для проростків гороху (Рис. 3.27).

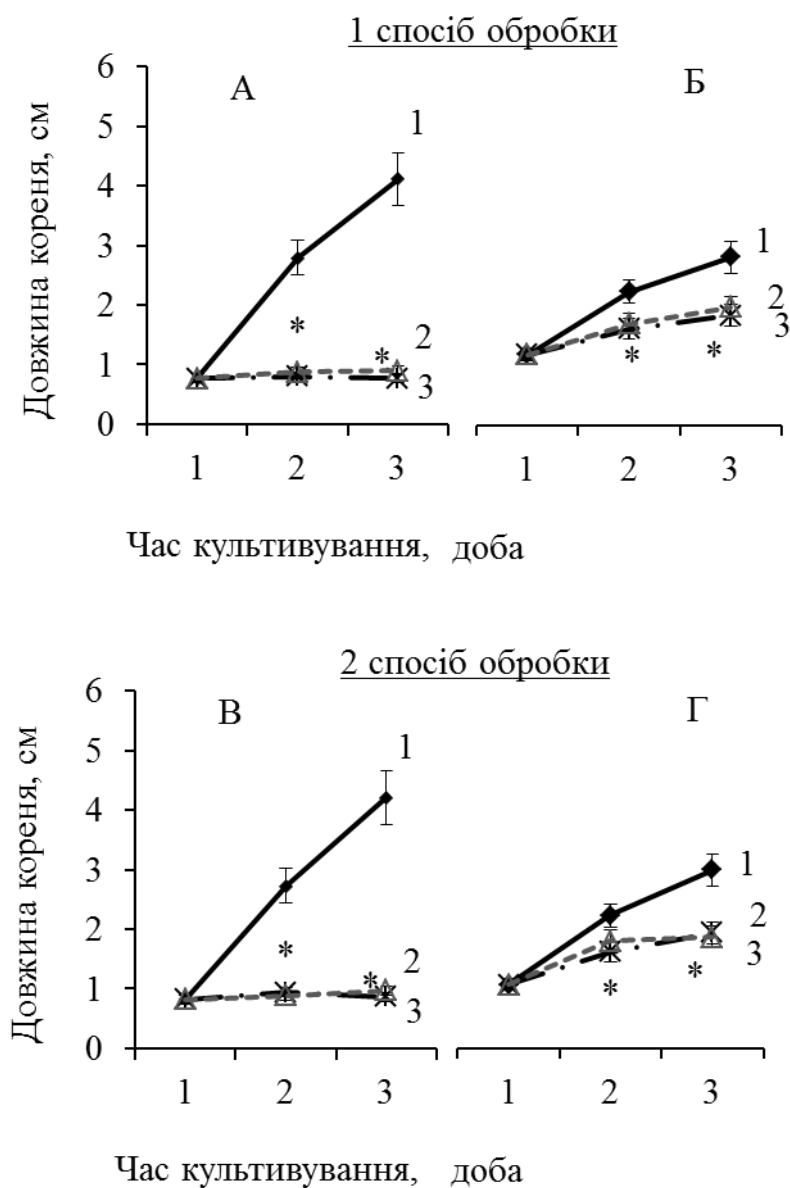


Рис. 3.27 Довжина кореня проростків пшениці (А, В) та гороху (Б, Г) після внесення культур мікроорганізмів *Bacillus cereus* (2) та *Bacillus popilliae* (3), 1 - в культуру проростків вносили дистильовану стерильну воду. Зерна пшениці і гороху обробляли 1-м і 2-м способами передпосівної обробки

\*- достовірні відмінності в порівнянні з контролем  $P \leq 0,05$

Отже, екзогенні мікроорганізми роду *Bacillus*, що вносяться до культури проростків в кількості 7 мл та 10 мл для пшениці та гороху відповідно, зупиняли ріст проростків пшениці та інгібували ріст проростків гороху. Ці результати вказують на те, що при культивуванні проростків у водних культурах для отримання корневих екзометаболітів пшениці та гороху необхідно повне видалення мікроорганізмів.

### **3. 3. 4 Антиоксидантна та антирадикальна активність корневих екзометаболітів проростків пшениці в системі *in vitro***

Як відомо, редокс-система є однією з найбільш древніх систем регуляції. Про характер її функціонування можна судити по співвідношенню прооксидантно та антиоксидантної активностей в організмі. Тривалі дослідження процесів вільнорадикального окислення показали, що більшість відомих патологій пов'язане з проявом окисного стресу [58, 147, 215]. Як відомо, лікарські препарати та біологічно активні сполуки можуть проявляти як про-, так і антиоксидантні властивості. При випробуванні нових субстратів і надалі їх застосування необхідно знати про їх вплив на редокс-системи клітини і організму в цілому. Для цього тестування антиоксидантної активності випробуваних речовин проводять на модельних системах *in vitro*.

Виявилося, що близько 50 % утворюються ОН-радикалів в системі перехоплювалися молекулами спирту. У тому випадку, якщо в систему вносили такий же обсяг води, то інтенсивність перехоплення була відсутня (Рис. 3.28А).

При внесенні в систему КЕМ 1-денних проростків пшениці величина перехоплення вільних радикалів становила понад 40 %, у 2 добових проростків цей показник достовірно не відрізнявся від 1-добових, а у 3 добових він незначно збільшувався (Рис. 3.28А).

Отже, КЕМ 1-3-добових проростків володіли вираженою здатністю до перехоплення вільних радикалів в системі *in vitro*, яка не поступалася прийнятому стандарту - етилового спирту.

При визначенні антиоксидантної активності в системі *in vitro* прийнято використовувати в якості стандарту  $\alpha$ -токоферол. Виявилося, що токоферол виявляв виражену антиоксидантну активність, яка була відсутня у води (Рис. 3.28Б).

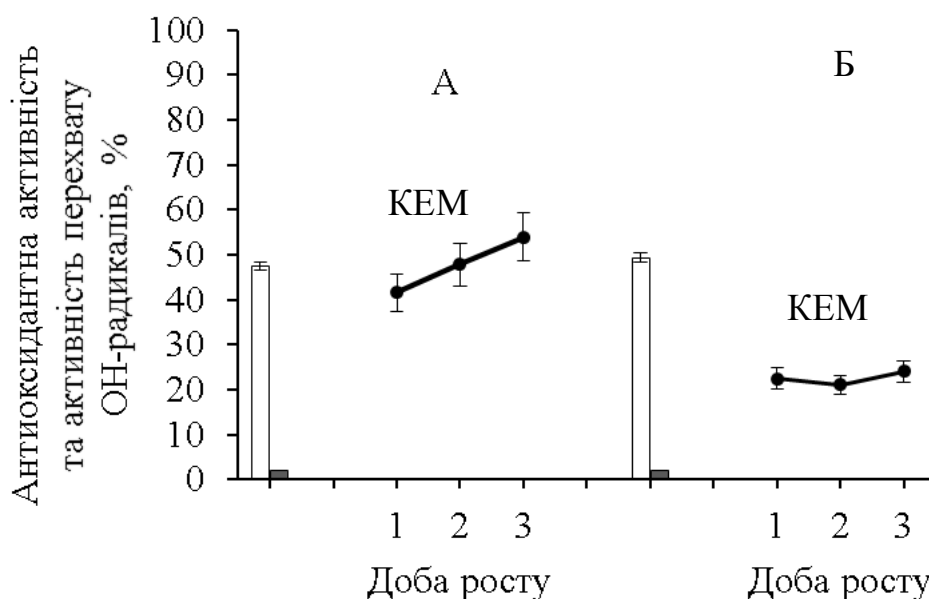


Рис. 3.28 Інтенсивність перехоплення гідроксильних радикалів (А) та антиоксидантна активність (Б) корневих екзометаболітів 1, 2 та 3 добових проростків пшениці в системі *in vitro*, виражена у відсотках. На гістограмі показана відповідна активність етилового спирту (5 мг / мл) (А, □),  $\alpha$ -токоферолу (7 мкг / мл) (Б, □) і фізіологічного розчину (відсутність активності)

КЕМ 1-3 добових проростків пшениці мали виражену антиоксидантну активність, яка була лише на 25 % менше токоферолу в системі *in vitro* (Рис. 3.28Б). Антиоксидантна активність не розрізнялася у 1, 2 та 3-добових проростків.

Отже, КЕМ 1-3-добових проростків пшениці проявляли виражену антиоксидантну активність та в системі *in vitro*.

Раніше на іншій моделі була показана кореляція між антиоксидантною активністю в системі *in vitro* та *in vivo* [81]. Це дозволяє припустити, що антиоксидантну активність, виявлену *in vitro*, КЕМ проявлятимуть та в системі *in vivo*.

Отримані результати дозволяють припустити, що КЕ впливають на редокс-систему. Так як, редокс-система бере участь в регуляції метаболізму як прокаріотичних, так і еукаріотів, то КЕМ можуть проявляти активність широкого спектра (поліфункціональність) по відношенню до різних організмів.

### **3. 3. 5 Вплив КЕМ проростків пшениці на регенерацію печінки щурів після часткової гепатектомії**

Як відомо, часткова гепатектомія індукує регенерацію печінки за рахунок проліферації клітин (посилення синтезу ДНК та РНК) [243]. Так, в нашому дослідженні швидкість синтезу ДНК після часткової гепатектомії збільшувалася в 2,7 рази, а РНК - в 1,6 рази в порівнянні з інтактним контрольним рівнем (Рис. 3.29).

У тому випадку, коли тваринам через годину після операції часткової гепатектомії вводили КЕМ, а через 24 години визначали питому радіоактивність ДНК, вона була вище контролю (часткова гепатектомія без КЕМ) в 7 разів при дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Збільшення дози КЕМ до 0,5 мг / 100 г маси тіла призводило до прискорення синтезу ДНК тільки в 8 разів у порівнянні з контролем, а подальше збільшення дози до 1,0 мг / 100 г маси тіла знижувало ефект стимуляції синтезу ДНК, хоча він був ще добре виражений (Рис. 3.29).

Отже, внутрішньочеревне введення тваринам корневих екзометаболітів викликало S-образне дозозалежне збільшення швидкості синтезу ДНК.

Введення КЕМ тваринам після часткової гепатектомії в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла збільшувало швидкість синтезу і РНК в 3 рази в порівнянні з контрольною групою, а при введенні КЕМ в дозі 0,5 мг / 100 г маси тіла швидкість синтезу РНК збільшувалася в 4,5 рази в порівнянні з контролем. Велика доза КЕМ (1,0 мг / 100 г маси тіла), як і в випадку з ДНК, надавала менший ефект.

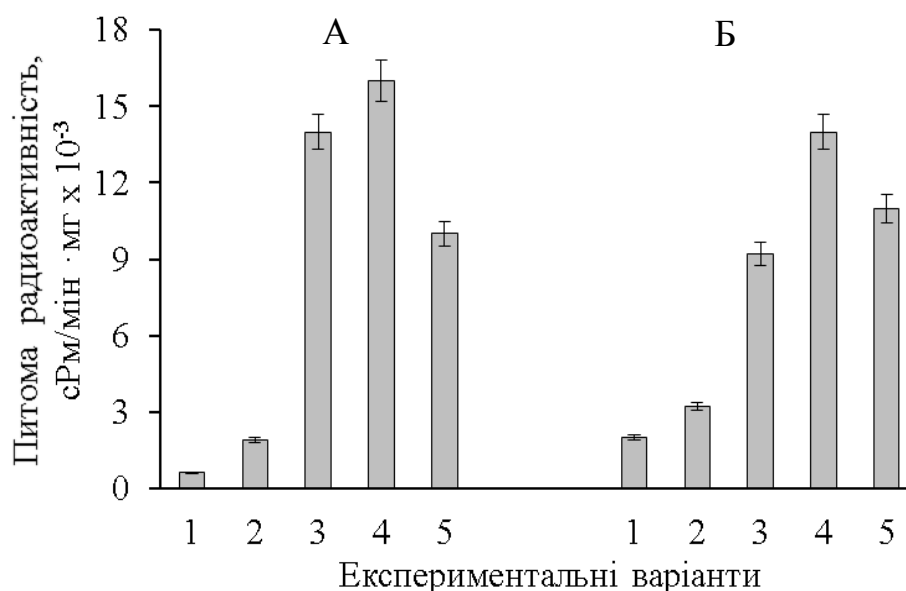


Рис. 3.29 Питома радіоактивність ДНК (А) і РНК (Б) клітинних ядер печінки щурів. Варіанти експерименту: 1 - інтактна печінка; 2 - печінка через 22 години після часткової гепатектомії; 3-5 - варіант 2 + введення КЕМ в дозі 0,1; 0,5 і 1,0 мг / 100 г маси тіла

Отже, КЕМ в досліджуваних дозах надавав дозозалежний ефект як на швидкість синтезу ДНК, так і РНК після часткової гепатектомії [147].

Одним з підходів у розвитку корневих біотехнологій є, по-перше, розробка системи тестових оцінок багатокomпонентних сумішей на основі принципу ієрархічності, тобто оцінка відповіді на молекулярному,



субклітинному, клітинному і організмівому рівнях і визначення характеристики у відповідь на їх дію у різних об'єктів. При такому підході можна буде оцінити поліфункціональність досліджуваної субстанції і визначити стабільність їх в процесі зберігання (щодо збереження активності).

По-друге, необхідно сформулювати концепцію відповіді біологічних систем на багатоконпонентні суміші біологічного походження.

Велика частина наших знань в області механізмів дії: ксенобіотик (біологічно активних речовин) → біологічна система → відповідь системи, побудованої на принципі монологандних взаємодій: ліганд → рецептор (мішень). Однак в реальних природних процесах завжди має місце не монологандне, а полілігандна взаємодія, але механізми формування таких відповідей залишаються маловивченими.

Для пояснення полілігандних (багатофакторних) взаємодій був запропонований принцип змінно-домінуючих факторів (ПДФ) (51).

Таким чином:

1- КЕМ 1-3 добових проростків пшениці мають виражені антирадикальні властивості, які виявлялися при внесенні їх в середу *in vitro*.

2- Введення експериментальним щурам КЕМ в дозах 0,1, 0,5 і 1,0 мг по сухій речовині / 100 г маси тіла у яких хірургічно видалена 2/3 маси печінки (часткова гепатектомія) збільшувало швидкість синтезу ДНК і РНК з вираженим дозозалежним ефектом. Це може свідчити про гепатотропність КЕМ і зокрема в прискоренні процесу регенерації печінки на фоні печінкової недостатності.

Внесення КЕМ в систему *in vitro* надавали добре виражену здатність до перехоплення гідроксильних радикалів (основні продукти вільнорадикальних реакцій) і антиокислювальну активність. Відомо, що такі природні сполуки як  $\alpha$ -токоферол, ретинол, каротиноїди, фенольні сполуки та ін. Мають виражену антирадикальну активність [44, 166]. До складу КЕМ входять фенольні з'єднання зі спареними подвійними зв'язками, вітаміни та інші сполуки виявляють властивості скавенджерів [179, 209]. Цим і пояснюється

антирадикальна активність КЕМ яка проявляється вже у 1-добових проростків пшениці і залишається незмінною якщо їх отримувати у 1-3 добових проростків. Отже, 1-3-добові проростки можуть служити джерелом отримання скевенджерів природного походження.

Ці результати можуть вказувати на те, що компоненти КЕМ можуть впливати на метаболізм шляхом зміни редокс-системи клітини і регуляції метаболізму на рівні вторинних посередників. Показано, що продукти вільнорадикальних реакцій поряд з індукцією патологічних процесів (у великих концентраціях) забезпечують і регуляцію багатьох реакцій в фізіологічних концентраціях [258]. У зв'язку з цим, необхідно домагатися не повного усунення продуктів вільнорадикальних реакцій в біологічних системах, а їх модуляції, що, можливо, і можуть забезпечувати компоненти КЕМ не тільки в системі *in vitro*, але та *in vivo*.

КЕМ містять велику кількість низькомолекулярних компонентів, здатних індукувати цілий ряд окислювально-відновних реакцій. Ці компоненти, впливаючи на редокс-потенціал зачіпають один з найдавніших, базових, інтеграційних рівнів регуляцій як у про-, так і у еукаріот. Однак різноманітність надбудов у вигляді регуляторних систем (молекулярної, клітинної та ін.) по-різному в залежності від видової приналежності і активності функціональних систем в момент взаємодії, будуть модифікувати ці сигнали, що і визначає прояв фенотипічної відповіді організму (Рис. 3.29).

### **Висновок до розділу 3**

Передпосівна обробка насіння незначно інгибувала схожість насіння пшениці і це ще в меншій мірі проявлялося в разі такої ж передпосівної обробки насіння гороху.

Передпосівна обробка насіння пшениці 2-м та 3-м способами (2-30 секунд в 70 % етиловому спирті  $C_2H_5OH$ , та на 30 хвилин в 5 % гіпохлорит натрію  $NaOCl$ ; 3 – 5 хвилин в 70 % етиловому спирті  $C_2H_5OH$ ,

та на 40 хвилин в 5 % гіпохлорит натрію NaOCl) стимулювала ріст проростків пшениці на 2 та 3 добу росту. Стимуляція інтенсивності росту проростків гороху була виражена в більшій мірі (100 %) у порівнянні з пшеницею (25 %), однак це проявлялося тільки після 3-го способу передпосівної обробки насіння.

Кількість корневих екзометаболітів пшениці майже лінійно збільшувалася з 1 по 3 добу росту коренів. Після 1-го та 2-го способів передпосівної обробки насіння загальна кількість корневих екзометаболітів збільшувалася на 25 % та 20 % відповідно на 3 добу росту. Тоді як 3-й спосіб передпосівної обробки насіння пригнічував екскреторну активність проростків пшениці.

Передпосівна обробка насіння 3-м способом (5 хвилин в 70 % етиловому спирті  $C_2H_5OH$ , та на 40 хвилин в 5 % гіпохлорит натрію NaOCl) приводила до зміни складу корневих екзометаболітів - значного збільшення кількості білків – 72 % від загальної кількості КЕМ.

Передпосівна обробка насіння впливала на інтенсивність ростуризосферної мікробіоти проростків пшениці.

Кількість корневих екзометаболітів гороху в контрольному варіанті було більшим у порівнянні з таким пшениці в 4 рази і не змінювалося з 1 по 3 добу росту і тільки 3-й спосіб передпосівної обробки насіння гороху збільшував вміст корневих екзометаболітів на 3 добу росту на 34 % в порівнянні з контролем.

Якщо склад корневих екзометаболітів пшениці був представлений з великою кількістю вуглеводів (50-67 %), то гороху - білками (80-85 %). Передпосівна обробка насіння гороху не чинила суттєвого впливу на інтенсивність екскреції і склад корневих екзометаболітів. При культивуванні мікробіоти ризосфери коренів гороху виявили нелінійний характер кривої росту, що свідчить про наявність в корневих екзометаболітах гороху декількох видів мікроорганізмів.

При побудові дивних атракторів динаміки росту коренів пшениці та гороху виявили виражені їх відмінності, що свідчить про різну ступінь варіабельності росту.

Виявили, що якщо у проростків пшениці в ризосфері кореня присутні близько сотні прикордонних клітин, то у гороху вже на 1 добу росту їх було вже 1500 і їх кількість.

На насінні пшениці, методом ПЛР і визначенням послідовностей 16S рРНК, виявили *Pantoe agglomerans* strain C410P1 та *Pseudomonas fluorescens* strain SBW 25, а на насінні гороху - *Klebsiella pneumoniae* strain VB-1.5, *Bacillus safensis* strain 18, *Bacillus pumilus* strain G006, *Staphylococcus pasteurii* strain SMJ3. ці види мікроорганізмів можуть бути віднесені до епіфітних мікроорганізмів, вони не видаляються багаторазовим промиванням дистильованою водою.

Обробка насіння пшениці етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію пригнічує ріст епіфітних мікроорганізмів. Для видалення епіфітома насіння гороху необхідно проводити послідовну обробку перманганатом калію, етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію.

Показано, що кореневі екзометаболіти, отримані у 1 добових проростків гороху, стимулюють ріст коренів пшениці на 58 % у 3 добових проростків, а кореневі екзометаболіти проростків пшениці стимулювали ріст проростків гороху тільки на 34 %.

Кореневі екзометаболіти пшениці та гороху можуть бути використані в якості селективних поживних середовищ для різних штамів бактерій.

Показано, що екзогенні культури *Bacillus cereus* та *Bacillus popilliae* надавали різний вплив на ріст проростків. Так, вони інгібували ріст проростків пшениці, а в разі гороху мало місце затримка швидкості росту проростків.

Показали, що проростки пшениці мали виражену антиоксидантну активність і здатність перехоплювати вільні радикали в системі *in vitro*.

Кореневі екзометаболіти пшениці після внутрішньочеревного введення в організм експериментальних тварин в дозах 0,1, 0,5 та 1,0 мг сухого РЗЕ / 100 г масі тіла збільшували швидкість синтезу ДНК та РНК в клітинах печінки після часткової гепатектомії, що вказує на посилення процесу регенерації печінки.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [22, 27,47,142,147].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі показано, що при культивуванні проростків пшениці й гороху в водній культурі при температурі 24-26 °С, при постійному освітленні у водне середовище на 1 добу росту корені гороху екскретують 5,8 мкг / 100 зерен, а корені пшениці – 1,42 мкг / 100 зерен. Передпосівна обробки насіння пшениці й гороху впливає на кількісний, якісний склад корневих екзометаболітів та на склад епіфітної мікрофлори насіння пшениці та гороху. КЕМ мають різну біологічну активність, що може бути використано в корневих біотехнологіях при отриманні біологічноактивних сполук.

1. Передпосівна обробка насіння пшениці (етиловим спиртом та гіпохлоритом натрія – 2 і 3 способи) на 3 добу росту прискорювала рост коренів проростків пшениці на 25 % і 40 % відповідно, а рост коренів гороху (3 спосіб) – около 100 %.

2. Кількість корневих екзометаболітів пшениці майже лінійно збільшувалася з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння пшениці (перманганатом калія; етиловим спиртом та гіпохлоридом натрія – 2 спосіб) супроводжувалася збільшенням кількості корневих екзометаболітів на 25 % і 20 % відповідно на 3 добу росту.

3. Кількість корневих екзометаболітів гороху в контрольному варіанті вже на 1 добу росту проростків становило 5832 мкг / 100 зерен, що в 4 рази більше в порівнянні з пшеницею. Кількість корневих екзометаболітів гороху залишалось незмінним з 1 по 3 добу росту. Передпосівна обробка насіння гороху 3-м способом збільшувала вміст корневих екзометаболітів на 42 % на 3 дібу росту в порівнянні з 1 добою росту.

4. Кореневі екзометаболіти пшениці контрольного варіанту представлені на 67 % вуглеводами, на 25 % білками, а на вільні амінокислоти – 8 %. У той же час екзометаболіти гороху були представлені в основному

білками – 85 %, на вуглеводи і вільні амінокислоти доводилося 10 % та 5 % відповідно.

5. У ризосфері коренів пшениці («закрита» меристема) контрольного варіанту виявили близько сотні прикордонних клітин, а в ризосфері коренів гороху («відкрита» меристема) - понад тисячу.

6. На насінні пшениці присутні епіфітні мікроорганізми – *Pantoe agglomerans* і *Pseudomonas fluorescens*, які інактивуються передпосівної обробкою насіння (2-м способом). На насінні гороху присутні *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus pasteurii*, з яких можуть бути інактивовані *Staphylococcus pasteurii*, *Klebsiella pneumoniae* послідовною обробкою насіння гороху перманганатом калію, етиловим спиртом та гіпохлоритом натрію.

7. Перехресне внесення кореневих екзометаболітів до проростків пшениці і гороху мало різний стимулюючий ефект на рост проростків. Так, кореневі екзометаболіти гороху стимулювали рост проростків пшениці в водній культурі на 58 % на 3 дібу росту, якщо їх вносили на 1 добу росту після проростання. Внесення в водну культуру гороху кореневих екзометаболітів пшениці прискорювало ріст проростків гороху на 34 %. Кореневі екзометаболіти пшениці мали виражену антиоксидантну активність і прискорювали активність клітин печінки після часткової гепатектомії у щурів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гродзинский Д. М. Надежность растительных экосистем. Киев, 1983. 367 с.
2. Ковальова М. К., Азіз З. А. Вплив передпосівної обробки насіння гороху на склад водних корневих екзометаболітів // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XIII наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України, 24–25 жовтня 2018 р. Чернігів, 2018. С. 160-162.
3. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656-662.
4. Феоктистова Н. В., Марданова А. М., Хадиева Г. Ф., Шарипова М. Р. Ризосферные бактерии // Ученые записки казанского университета. Серия естественные науки. 2016. Т. 158, кн. 2. С. 207-224.
5. Abed A. R., Hussein I. M. In vitro study of antibacterial and antifungal activity of some common antiseptics and disinfectants agents // Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences. 2016. Vol. 7(1). P. 148-159.
6. Adeleke R., Nwangburuka C., Oboirien B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review // South African Journal of Botany. 2017. Vol. 108. P. 393-406.
7. Agathokleous E. Environmental hormesis, a fundamental non-monotonic biological phenomenon with implications in ecotoxicology and environmental safety // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. Vol. 148. P. 1042-1053.
8. Agathokleous E., Kitao M., Calabrese E. J. Hormetic dose responses induced by lanthanum in plants // Environmental Pollution. 2019. Vol. 244. P. 332-341.
9. Agathokleous E., Kitao M., Calabrese E. J. Human and veterinary antibiotics induce hormesis in plants: Scientific and regulatory issues and an environmental perspective // Environment International. 2018. Vol. 120. P. 489-495.



10. Agathokleous E., Kitao M., Harayama H., Calabrese E. J. Temperature-induced hormesis in plants // *Journal of Forestry Research*. 2018. Vol. 30(1). P. 13-20.
11. Agathokleous, E., Kitao, M., Calabrese, E. J. Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science // *Trends in Plant Science*. 2019. Vol. 24(4). P. 318-327.
12. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective // *Journal of King Saud University – Science*. 2014. Vol. 26(1). P. 1-20.
13. Ahmad F., Husain F. M., Ahmad I. Rhizosphere and Root Colonization by Bacterial Inoculants and Their Monitoring Methods: A Critical Area in PGPR Research // *Microbes and Microbial Technology*. 2011. P. 363-391.
14. Alawiye T. T., Babalola O. O. Bacterial Diversity and Community Structure in Typical Plant Rhizosphere // *Diversity*. 2019. Vol. 11(10). P. 179-187.
15. Alegria Terrazas R., Giles C., Paterson E., Robertson-Albertyn S., Cesco S., Mimmo T., Bulgarelli D. Plant–Microbiota Interactions as a Driver of the Mineral Turnover in the Rhizosphere // *Advances in Applied Microbiology*. 2016. P. 1-67.
16. Alori E. T., Babalola O. O. Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1-12.
17. Amb M. K., Ahluwalia A. S. Allelopathy: Potential Role to Achieve New Milestones in Rice Cultivation // *Rice Science*. 2016. Vol. 23(4). P. 165-183.
18. Araújo S., Paparella S., Dondi D., Bentivoglio A., Carbonera D., Balestrazzi A. Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology // *Frontiers in plant science*. 2016. Vol. 7. P. 1-12.
19. Ashraf M., Foolad M. R. Pre-Sowing Seed Treatment—A Shotgun Approach to Improve Germination, Plant Growth, and Crop Yield Under Saline and Non- Saline Conditions // *Advances in Agronomy*. 2005. Vol. 88. P. 223-271.
20. Aslam F., Khaliq A., Matloob A., Tanveer A., Hussain S., Zahir Z. A. Allelopathy in agro-ecosystems: a critical review of wheat allelopathy-concepts and implications // *Chemoecology*. 2016. Vol. 27(1). P. 1-24.

21. Azeez Z. A. Multiple diagnosis of bacteria that live on the surface of wheat seeds // Біотехнологія: звершення та надії: VI науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14-16 листопада 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 270.
22. Azeez Z. A., Bozhkov A. I., Mahmood M. T. and Kovalova M. K. The species composition of epiphytic microorganisms and their influence on roots excretory activity of wheat and pea seedlings // Biochem. Cell. Arch. 2019. Vol. 19(2). P. 3809-3818.
23. Azeez Z. A., Chumbash K. V. The influence of different methods of pre-sowing seeds process on root growth and on the microbes's composition of wheat seedling // Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки / BioScience Advances: XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, 18-21 квітня 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 8.
24. Azeez Z. A., Kovalova M. K., Jebur A. M. The removal of pathogenic microorganisms from the surface of pea grain depends on the method of treating seeds // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології: матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7-8 листопада 2018 р. Вінниця, 2018b. С. 133-134.
25. Azeez Z. A., Kovalova M. K., Mahmood M. T. The use of root exudates as a nutrient medium for some types of bacteria // Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського: матеріали науково-практичної конференції, 12 лютого 2020 р. Харків, 2020. С. 59-60.
26. Azeez Z., Kovalova M. The characteristics of the excretory system of wheat roots in the early stages of growth (1 st – 3 rd day) // Молодь і поступ біології: XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, 10-12 квітня 2018 р.: тези доп. Львів, 2018. С. 127-128.
27. Azeez Z., Kovalova M., Bozhkov A. Effects of pre-sowing seed treatment on the growth rate of seedlings and the activity of the excretory system of the wheat root

- in aquatic culture // International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 2018a. Vol. 11(3). P. 573-583.
28. Badri D. V., Chaparro J. M., Zhang R., Shen Q., Vivanco J. M. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288(7). P. 4502-4512.
  29. Badri D. V., Loyola-Vargas V. M., Broeckling C. D., De-la-Peña C., Jasinski M., Santelia D., Enrico Martinoia E., Sumner L. W., Banta L. M., Stermitz F., Vivanco J. M. Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants // Plant physiology. 2008. Vol. 146(2). P. 762-771.
  30. Badri D. V., Vivanco J. M. Regulation and function of root exudates. Plant // Cell & Environment. 2009. Vol. 32(6). P. 666-681.
  31. Badri D. V., Weir T. L., van der Lelie D., Vivanco J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions // Current Opinion in Biotechnology. 2009. Vol. 20(6). P. 642-650.
  32. Bahadur S., Verma S. K., Prasad S. K., Madane A. J., Maurya S. P., Gaurav, Verma V. K., Siha S. K. Eco-friendly weed management for sustainable crop production-A review // Journal Crop and Weed. 2015. Vol. 11(1). P. 181-189.
  33. Bais H. P., Park S., Weir T. L., Callaway R. M., Vivanco J. M. How plants communicate using the underground information superhighway // Trends in Plant Science. 2004. Vol. 9(1). P. 26-32.
  34. Baluška F. Plant-Environment Interactions. Signaling and Communication in Plants. Berlin. 2009. 301 p.
  35. Bargaz A., Lyamlouli K., Chtouki M., Zeroual Y., Dhiba D. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. P. 1-25.
  36. Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture // Biotechnology Advances. 1998. Vol. 16(4). P. 729-770.

37. Battey N. H. Blackbourn H. D. The control of exocytosis in plant cells // *New phytol.* 1993. Vol. 125. P. 307-338.
38. Behrens C. E., Smith K. E., Iancu C. V., Choe J., Dean J. V. Transport of anthocyanins and other flavonoids by the Arabidopsis ATP-Binding cassette transporter AtABCC2 // *Scientific Reports.* 2019. Vol. 9(1). P. 437.
39. Bell I. R., Ives J. A., Wayne B. J. Nonlinear effects of nanoparticles: biological variability from hormetic doses, small particle sizes, and dynamic adaptive interactions // *Dose-Response.* 2013. Vol. 12(2). P. 202-232.
40. Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // *Genetics and Molecular Biology.* 2012. Vol. 35(4). P. 1044-1051.
41. Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. M. The rhizosphere microbiome and plant health // *Trends in Plant Science.* 2012. Vol. 17(8). P. 478-486.
42. Berg G., Köberl M., Rybakova D., Müller H., Grosch R., Smalla K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends // *FEMS Microbiology Ecology.* 2017. Vol. 93(5). P. 1-24.
43. Bertin C., Yang X., Weston L. A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere // *Plant and Soil.* 2003. Vol. 256. P. 67-83.
44. Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Hernández Blanco, I., Hoffmann T., Martin H.-D., Mayer B., Noack P., Ruck CH., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., Walsh R. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions // *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2001. Vol. 81(6). P. 559-568.
45. Bhatia S. Introduction to Pharmaceutical Biotechnology. History, scope and development of biotechnology // *IOP Publishing Ltd.* 2018. Vol. 1(1). P. 1-61.
46. Borghi L., Kang J., de Brito Francisco R. Filling the gap: functional clustering of ABC proteins for the investigation of hormonal transport in planta // *Frontiers in Plant Science.* 2019. Vol. 10. P. 1-20.

47. Bozhkov A. I., Kovalova M. K., Azeez Z. A., Goltvjansky A. V. The effect of pre-sowing seed treatment on seedlings growth rate and their excretory activity // Regulatory mechanism in biosystem. 2020. Vol. 11(1). P. 60-66.
48. Bozhkov A. I., Kuznetsova Y. A., Menzyanova N. G. Effect of sodium fluoride on the root apex border cells in one-day-old wheat seedlings // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. Vol. 56(4). P. 480-487.
49. Bozhkov A. I., Kuznetsova Y. A., Menzyanova N. G. Interrelationship between the growth rate of wheat roots, their excretory activity, and the number of border cells // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 54(1). P. 97-103.
50. Bozhkov A. I., Kuznetsova Yu. A., Menzyanova N. G. Kovaleva M. K. The role of root border cells in the formation of a root-microenvironment system in wheat seedlings // From Seed Germination to Young Plants: Ecology, Growth and Environmental: Influence: Nova Publishers, 2013. P. 124-148.
51. Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Kovalyova M. K. Annual rhythm of growth intensity of microalgal culture *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) and fluctuations of some heliophysical factors // Int. J. Algae. 2009. Vol. 10. P. 350-364.
52. Bozhkov A. I., Sidorov V. I., Dlubovskaya V. L., Shevtsova M. Ya., Surov Yu. N. Appearance of the imprinting effect on the specific pattern of intracellular distribution of copper ions in the liver after exposure to high concentrations of copper sulfate // Biomeditsinskaya khimiya. 2010. Vol. 56(2). P. 195-208.
53. Bozhkov A. I., Sidorov V. I., Kurguzova N. I., Dlubovskaia V. L. Metabolic memory enhances hormesis effect to the copper ions in age-depended manner // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 27(1). P. 72-80.
54. Bozhkov A. I., Kabachnyy V. I., Kolot N. V., Bondar A. Yu., Chumak I. V. Hormesis effect and the influence of ultra-low glycosides doses on the bone marrow cells proliferative activity in culture // Jour. Harmo. Res. Pharm. 2014. Vol. 3(4). P. 154-166.

55. Brahmaaprakash G. P., Sahu P. K., Lavanya G., Nair S. S., Gangaraddi V. K., Gupta A. Microbial functions of the rhizosphere // *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. 2017. P. 177-210.
56. Brito I. P., Tropaldi L., Carbonari C. A., Velini E. D. Hormetic effects of glyphosate on plants // *Pest Management Science*. 2017. Vol. 74(5). P. 1064-1070.
57. Brukhin V., Morozova N. Plant Growth and Development - Basic Knowledge and Current Views // *Math. Model. Nat. Phenom*. 2011. Vol. 6(2). P. 1-53.
58. Bullon P., Newman H. N., Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? // *Periodontology 2000*. 2013. Vol. 64(1). P. 139-153.
59. Cai Z., Kastell A., Knorr D., Smetanska I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures // *Plant Cell Reports*. 2011. Vol. 31(3). P. 461-477.
60. Calabrese E. J. Hormesis commonly observed in the assessment of aneuploidy in yeast // *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 225. P. 713-728.
61. Calabrese E. J. Hormesis: a fundamental concept in biology // *Microbial cell (Graz, Austria)*. 2014. Vol. 1(5). P. 145-149.
62. Calabrese E. J. Hormesis: Path and Progression to Significance // *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19. P. 1-15.
63. Calabrese E. J. Preconditioning is hormesis part I: Documentation, dose-response features and mechanistic foundations // *Pharmacological Research*. 2016a. Vol. 110. P. 242-264.
64. Calabrese E. J. Preconditioning is hormesis part II: How the conditioning dose mediates protection: Dose optimization within temporal and mechanistic frameworks // *Pharmacological Research*. 2016b. Vol. 110. P. 265-275.

65. Calabrese E. J., Baldwin L. A. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis // *Human & Experimental Toxicology*. 2000. Vol. 19(1). P. 41-75.
66. Calabrese E. J., Baldwin, L. A. Defining hormesis // *Human & Experimental Toxicology*. 2002. Vol. 21(2). P. 91-97.
67. Calabrese E. J., Baldwin, L. A. Hormesis as a biological hypothesis // *Environmental Health Perspectives*. 1998. Vol. 106(1). P. 357-362.
68. Calabrese E. J., Baldwin, L. A. The marginalization of hormesis // *Toxicologic Pathology*. 1999. Vol. 27(2). P. 187-194.
69. Calabrese E. J., Blain, R. B. Hormesis and plant biology // *Environmental Pollution*. 2009. Vol. 157(1). P. 42-48.
70. Calabrese E. J., Dhawan G., Kapoor R., Iavicoli I., Calabrese V. Hormesis: a fundamental concept with widespread biological and biomedical applications // *Gerontology*. 2015. Vol. 62(5). P. 530-535.
71. Calabrese E. J., Mattson M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? // *NPJ aging and mechanisms of disease*. 2017. Vol. 3(13). P. 1-8.
72. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A. T., Calabrese E. J., Mattson M. P. Cellular Stress Responses, The hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders // *Antioxidants & Redox Signaling* 2010. Vol. 13(11). P. 1763-1811.
73. Canarini A., Wanek W., Merchant A., Richter A., Kaiser Ch. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. P. 1-19.
74. Chaparro J. M., Badri D. V., Bakker M. G., Sugiyama A., Manter D. K., Vivanco J. M. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions // *PloS one*. 2013. Vol. 8(2). P. 1-10 (e55731).
75. Chen S. K., Edwards C. A., Subler S. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations // *Soil Biology and Biochemistry*. 2001. Vol. 33(14). P. 1971-1980.

76. Cheng F., Cheng Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy // *Frontiers in plant science*. 2015. Vol. 6. P. 1-16.
77. Colmenero-Flores J. M., Franco-Navarro J. D., Cubero-Font P., Peinado-Torrubia P., Rosales M. A. Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: new roles and REgulation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20(19). P. 1-32.
78. Dahiya S., Kumar S., Khedwal R. S., Jakhar Sh. R. Allelopathy for sustainable weed management // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017. Vol. 6. P. 832-837.
79. Dal Cortivo C., Conselvan G. B., Carletti P., Barion G., Sella L., Vamerali T. Biostimulant effects of seed-applied sedaxane fungicide: morphological and physiological changes in maize seedlings // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 1-11.
80. Dal Corso G., Manara A., Piasentin S., Furini A. Nutrient metal elements in plants // *Metallomics* 2014. Vol. 6(10). P. 1770-1788.
81. De Martino L., Mencherini T., Mancini E., Aquino R. P., De Almeida L. F. R., De Feo V. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. Vol. 13(5). P. 5406-5419.
82. Delgado-Enciso I., Madrigal-Perez V., Lara-Esqueda A., Diaz-Sanchez M., Guzman-Esquivel J., Rosas-Vizcaino L., Virgen-Jimenez O. O., Kleiman-Trujillo J., Lagarda-Canales M. R., Ceja-Espiritu G., Rangel-Salgado V., Lopez-Lemus U. A., Delgado-Enciso J., Lara-Basulto A., Soriano-Hernandez, A. Topical 5 % potassium permanganate solution accelerates the healing process in chronic diabetic foot ulcers // *Biomedical Reports*. 2018. Vol. 8. P. 156-159.
83. Delory B. M., Delaplace P., Fauconnier M. L., Jardin P. D. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? // *Plant and Soil*. 2016. Vol. 402. P. 1-26.



84. Dennis P. G., Miller A. J., Hirsch P. R. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? // *FEMS Microbiology Ecology*. 2010. Vol. 72(3). P. 313-327.
85. Ding L.-J., Cui H.-L., Nie S.-A., Long X.-E., Duan G.-L., Zhu Y.-G. Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere // *FEMS Microbiology Ecology*. 2019. Vol. 95(5). P. 1-13.
86. Duke S. O., Lydon J., Koskinen W. C., Moorman T. B., Chaney R. L., Hammerschmidt R. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012. Vol. 60(42). P. 10375-10397.
87. Enebe M. C., Babalola O. O. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102(18). P. 7821-7835.
88. Erofeeva E. A. Hormesis and paradoxical effects of pea (*Pisum sativum* L.) parameters upon exposure to formaldehyde in a wide range of doses // *Ecotoxicology*. 2018. Vol. 27(5). P. 569-577.
89. Farooq N., Abbas T., Tanveer A., Javaid M. M., Ali H. H., Safdar M. E., Khan A., Zohaib A., Shahzad B. Differential hormetic response of fenoxaprop-p-ethyl resistant and susceptible *phalaris* minor populations: a potential factor in resistance evolution // *Planta Daninha*. 2019. Vol. 37. P. 1-8.
90. Favaretto A., Scheffer-Basso S. M., Perez N. B. Allelopathy in Poaceae species present in Brazil. A review // *Agronomy for Sustainable Development*. 2018. Vol. 38(2). P. 1-12.
91. Finlay R. D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles // *Mycologist*. 2004. Vol. 18(2). P. 91-96.
92. Fischer G., Almanza-Merchan P. J., Ramirez F. Source-sink relationships in fruit species: A review // *Rev.colomb.cienc.hortic*. 2012. Vol. 6(2). P. 1-8.
93. Flores F. J., Garzon C. D. Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth in vitro of oomycetes and fungal plant pathogens // *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*. 2012. Vol. 11(3). P. 361-373.

94. Forde B. G. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update // *Current opinion in plant biology*. 2014. Vol. 21. P. 30-36.
95. Garcia J., Kao-Kniffin J. Microbial group dynamics in plant rhizospheres and their implications on nutrient cycling // *Frontiers in microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1-7.
96. Gargallo-Garriga A., Preece C., Sardans J., Oravec M., Urban O., Peñuelas J. Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery // *Scientific reports*. 2018. Vol. 8(1). P. 1-15.
97. Garzon C. D., Flores F. J. Hormesis: biphasic dose–responses to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture // In *Fungicides – Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. 2013. P. 311-328.
98. Georgiev M. I., Pavlov A. I., Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. Vol. 74(6). P. 1175-1185.
99. Ghimire B. K., Ghimire B., Yu C. Y. Chung I-M. Allelopathic and autotoxic effects of medicago sativa—derived allelochemicals // *Plants*. 2019. Vol. 8(7). P. 1-18.
100. Gmach M. R., Cherubin M. R., Kaiser K., Cerri C. E. P. Processes that influence dissolved organic matter in the soil: a review // *Sci. Agric*. 2018. Vol. 77(3). P. 1-10.
101. Goode L. K., Allen M. F. Seed germination conditions and implications for establishment of an epiphyte, *Aechmea bracteata* (Bromeliaceae) // *Plant Ecology*. 2009. Vol. 204(2). P. 179-188.
102. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R. K., Gowda C. L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities // *Biotech*. 2014. Vol. 5(4). P. 355-377.
103. Gram H. C. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten // *Fortschritte der Medizin*. 1884. Vol. 2. P. 185-189.

104. Guerrier A., Dong L., Bouwmeester H. J. Role and exploitation of underground chemical signaling in plants // *Pest management science*. 2019. Vol. 75, N. 9. P. 2455-2463.
105. Gul B., Saeed M., Khan H., Khan H., Khan M. I., Khan I. Impact of water hyacinth and water lettuce aqueous extracts on growth and germination of wheat and its associated troublesome weeds // *Applied ecology and environmental research*. 2017. Vol. 15(3). P. 939-950.
106. Haichar F. el Z., Santaella, C., Heulin T., Achouak W. Root exudates mediated interactions belowground // *Soil Biology and Biochemistry*. 2014. Vol. 77. P. 69-80.
107. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Aruoma O. I. The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals // *Analytical Biochemistry*. 1987. Vol. 165(1). P. 215-219.
108. Hamacher J., Hadizamani Y., Borgmann M., Mohaupt M., Männel D. N., Moehrlen U., Lucas R., Stammberger U. Cytokine–ion channel interactions in pulmonary inflammation // *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 8. P. 1-45.
109. Hardoim P. R. Biologically active compounds from bacterial endophytes // *Endophytes and Secondary Metabolites*. 2018. P. 1-29.
110. Hashmi M. Z., Naveedullah Shen H., Zhu S., Yu C., Shen C. Growth, bioluminescence and shoal behavior hormetic responses to inorganic and/or organic chemicals: A review // *Environment International*. 2014. Vol. 64. P. 28-39.
111. Hassan M. K., McInroy J. A., Kloepper J. W. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A review // *Agriculture*. 2019. Vol. 9(7). P. 1-13.
112. Hassan S., Mathesius U. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions // *Journal of Experimental Botany*. 2012. Vol. 63(9). P. 3429-3444.

113. Hastings A., Hom C. L., Ellner S., Turchin P., Godfray H. C. J. Chaos in ecology: is Mother nature a strange attractor? // *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1993. Vol. 24(1). P. 1-33.
114. Hawes M. C., Brigham L. A., Wen F., Woo H. H., Zhu Y. Function of root border cells in plant health: Pioneers in the Rhizosphere // *Annual Review of Phytopathology*. 1998. Vol. 36(1). P. 311-327.
115. Hawes M., Allen C., Turgeon B. G., Curlango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D. A., Xiong Z. Root border cells and their role in plant defense // *Annual Review of Phytopathology*. 2016. Vol. 54(1). P. 143-161.
116. Hayashi K., Hasegawa J., Matsunaga S. The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: endoreduplication precedes rapid cell expansion // *Scientific Reports*. 2013. Vol. 3(1). P. 1-8.
117. Hedrich R. Ion channels in plants // *Physiological reviews*. 2012. Vol. 92(4). P. 1777-1811.
118. Hernández M., Dumont M. G., Yuan Q., Conrad R. Different bacterial populations associated with the roots and rhizosphere of rice incorporate plant-derived carbon // *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. Vol. 81(6). P. 2244-2253.
119. Herz K., Dietz S., Gorzolka K., Haider S., Jandt U., Scheel D., Bruehlheide H. Linking root exudates to functional plant traits. *Plos one*. 2018. Vol. 13(10). P. e0204128.
120. Higgins G. M., Anderson R. N. Experimental pathology of liver: Restoration of liver of white rat following partial surgical removal // *Arch Pathol*. 1931. Vol. 12. P. 186-202.
121. Hiltner, L. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache // *Arb. Deut. Landw. Gesell*. 1904. Vol. 98. P. 59-78.
122. Hu L., Robert C., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B., Manzo D., Noemie Chervet N., Steinger T., van der Heijden M. G. A., Schlaeppi K., Erb M. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by

- shaping the rhizosphere microbiota // *Nature communications*. 2018. Vol. 9(1). P. 2738.
123. Huang X.-F., Chaparro J. M., Reardon K. F., Zhang R., Shen Q., Vivanco J. M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities // *Botany*. 2014. Vol. 92(4). P. 267-275.
  124. Igiehon N. O., Babalola O. O. Below-ground-above-ground plant-microbial interactions: focusing on soybean, rhizobacteria and mycorrhizal fungi // *The open microbiology journal*. 2018. Vol. 12. P. 261-279.
  125. Iqbal A., Shah F., Hamayun M., Hayat Khan Z., Islam B., Rehman G., Ullah Khan Z., Shah S., Hussain A., Jamal Y. Plants are the possible source of allelochemicals that can be useful in promoting sustainable agriculture // *Fresenius Environmental Bulletin*. 2019. Vol. 28(2). P. 1040-1049.
  126. Jabran K., Mahajan G., Sardana V., Chauhan B. S. Allelopathy for weed control in agricultural systems // *Crop Protection*. 2015. Vol. 72. P. 57-65.
  127. Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva, S. The Role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-current knowledge and future directions // *Frontiers in plant science*. 2017. Vol. 8. P. 1-19.
  128. Jones W. P., Kinghorn A. D. Extraction of plant secondary metabolites // *Natural Products Isolation*. 2012. P. 341-366.
  129. Kaczmarek M., Fedorowicz-Strońska O., Głowacka K., Waśkiewicz A., Sadowski J. CaCl<sub>2</sub> treatment improves drought stress tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016. Vol. 39(41). P. 1-11.
  130. Kaiser J. Hormesis: Sipping From a Poisoned Chalice // *Science*. 2003. Vol. 302(5644). P. 376-379.
  131. Kalaivani K., Kalaiselvi M. M., Senthil-Nathan S. Effect of methyl salicylate (MeSA), an elicitor on growth, physiology and pathology of resistant and susceptible rice varieties // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 1-11.
  132. Kandel S. L., Joubert P. M., Doty S. L. Bacterial endophyte colonization and distribution within Plants // *Microorganisms*. 2017. Vol. 5(4). P. 1-26.

133. Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y. Martinoia E. Plant ABC transporters // The arabidopsis book. 2011. Vol. 9. P. 1-25.
134. Kang Z., Babar M. A., Khan N., Guo J., Khan J., Islam S., Shahi D. Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat // Plos one. 2019. Vol. 14(3). P. 1-25.
135. Kavamura V. N., Robinson R. J., Hayat R., Clark I. M., Hughes D., Rossmann M., Hirsch P. R., Mendes R., Mauchline T. H. Land management and microbial seed load effect on rhizosphere and endosphere bacterial community assembly in wheat // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 10. P. 1-11.
136. Kim Y. X., Ranathunge K., Lee S., Lee Y., Lee D., Sung J. Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1-9.
137. Kitao M., Harayama H., Han Q., Agathokleous E., Uemura A., Furuya N., Ishibashi S. Springtime photoinhibition constrains regeneration of forest floor seedlings of *Abies sachalinensis* after a removal of canopy trees during winter // Scientific Reports. 2018. Vol. 8(1). P. 1-8.
138. Klebanov G. I., Babenkova I. V., Teselkin Yu. O. The estimation of antioxidant activity of blood serum using yolk lipoproteins // Labor delo. 1998. Vol. 5. P. 59-62
139. Kong C. H., Xuan T. D., Khanh T. D., Tran H.-D., Trung N. T. Allelochemicals and signaling chemicals in plants // Molecules. 2019. Vol. 24(15). P. 1-19.
140. Koo B. J., Adriano D. C., Bolan N. S., Barton C. D. Root exudates and microorganisms // Encyclopedia of Soils in the Environment. 2005. P. 421-428.
141. Korenblum E., Donga Y., Szymanski J., Pandaa S., Jozwiaka A., Massalha H., Meira S., Rogacheva I., Aharoni A. Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling // PNAS license. 2020. P. 1-10.

142. Kovalova M. K., Azeez Z. A., Bozhkov A. I., Kuznetsova Yu. A. Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // *Plant Archives*. 2020. Vol. 20, Supplement 1. P. 3041-3049.
143. Kretzschmar T., Burla B., Lee Y., Martinoia E., Nagy R. Functions of ABC transporters in plants // *Essays In Biochemistry*. 2011. Vol. 50. P. 145-160.
144. Krishnamurthy P., Ranathunge K., Franke R., Prakash H. S., Schreiber L., Mathew M. K. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) // *Planta*. 2009. Vol. 230(1). P. 119-134.
145. Kusakizako T., Miyauchi H., Ishitani R., Nureki O. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters // *BBA - Biomembranes*. 2019. P. 1-53.
146. Kuznetsova Y. A., Bozhkov A. I., Menzyanova N. G. Planting density and culture time of wheat seedlings affect their growth rate and exometabolite production // *Indian Journal of Plant Physiology*. 2018. Vol. 23(3). P. 557-563.
147. Kuznetsova Yu. A., Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Goltvyansky A. V., Azeez Z. A. Root exudates of wheat seedlings express antibacterial and antioxidant activity and stimulate proliferation of liver cells // *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2018. Vol. 9(4). P. 303-310.
148. Labarrere B., Prinzing A., Dorey T., Chesneau E., Hennion F. Variations of secondary metabolites among natural populations of sub-antarctic ranunculus species suggest functional redundancy and versatility // *Plants*. 2019. Vol. 8(7). P. 1-23.
149. Lareen A., Burton F., Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes // *Plant molecular biology*. 2016. Vol. 90(6). P. 575-587.
150. Latif S., Chiapusio G., Weston L. A. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence // *How Plants Communicate with Their Biotic Environment*. 2017. P. 19-54.
151. Law C. J., Maloney P. C., Wang D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters // *Annual review of microbiology*. 2008. Vol. 62. P. 289-305.

152. Lechowska K., Kubala S., Wojtyła Ł., Nowaczyk G., Quinet M., Lutts S., Garneczarska M. New insight on water status in germinating brassica napus seeds in relation to priming-improved germination // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20(3). P. 1-24.
153. Lee E.-H., Eo J.-K., Ka K.-H., Eom A.-H. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Roles in Ecosystems // *Mycobiology*. 2013. Vol. 41(3). P. 121-125.
154. Li L. Y., Feng C. X., Zhang Y. D. Influence of collection time on the determination of root exudates in *Fraxinus mandshurica* by the metabolomics method // *Applied ecology and environmental research*. 2019. Vol. 17(4). P. 9529-9545.
155. Li X-g., Zhang T-l., Wang X-x., Hua K., Zhao L., Han Z. The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. Vol. 9(2). P. 164-173.
156. Liu H. G., Wang Y. J., Hart M., Chen H., Tang M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates hormone and osmotic equilibrium of *Lycium barbarum* L. under salt stress // *Mycosphere*. 2016. Vol. 7(6). P. 828-843.
157. Liu J., Piñeros M. A., Kochian L. V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2014. Vol. 56(3). P. 221-230.
158. Liu J., Zhou M. The ALMT gene family performs multiple functions in plants // *Agronomy*. 2018. Vol. 8(2). P. 1-18.
159. Liu Z., Chen W., He X., Jia L., Yu S., Zhao M. Hormetic responses of *Lonicera Japonica* Thunb. to cadmium stress // *Dose-response*. 2015. Vol. 13(1). P. 14-33.
160. Lladó S., López-Mondéjar R., Baldrian P. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2017. Vol. 81(2). P. 1-27.
161. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall B. J. Protein measurement with folin phenol reagent // *The Journal of biological chemistry*. 1951. Vol. 193(1). P. 265-275.



162. Luster J., Finlay R. Handbook of methods used in rhizosphere research. Birmensdorf, Swiss Federal Research Institute WSL. 2006. 536 p.
163. Lutts S., Benincasa P., Wojtyla L., Kubala S., Pace R., Lechowska K., Garneczarska M. Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique // New Challenges in Seed Biology. Basic and Translational Research Driving Seed Technology. 2016. P. 1-46.
164. Lv J., Christie P., Zhang S. Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges // Environmental Science: Nano. 2019. Vol. 6. P. 41-59.
165. Madende M., Hayes M. Fish by-product use as biostimulants: an overview of the current state of the art, including relevant legislation and regulations within the EU and USA // Molecules. 2020. Vol. 25(5). P. 1-20.
166. Mandelker L., Vajdovich P. Antioxidant and anti-inflammatory effects of common pharmaceuticals and nutraceuticals // Studies on Veterinary Medicine. 2011. P. 233-251.
167. Manimegalai A., Manikandan A., Sheela R. Geetha S. Allelopathic influence of tectona grandis leaves on the germination of black gram and green gram // Int. J. Curr. Sci. 2012. Vol. 1. P. 241-244.
168. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // The Annals of Mathematical Statistics. 1947. Vol. 18(1). P. 50-60.
169. Marshall W. F., Young K. D., Swaffer M., Wood E., Nurse P., Kimura A., Frankel J., Wallingford J., Walbot V., Qu X., Roeder A. H. What determines cell size? // BMC biology. 2012. Vol. 10. P. 1-22.
170. Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S. I., Lee Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format // Analytical Biochemistry. 2005. Vol. 339. P. 69-72.
171. Mattson M. P. Hormesis defined // Ageing research reviews. 2008. Vol. 7(1). P. 1-7.

172. McNear Jr., D. H. The Rhizosphere - roots, soil and everything in between // Nature Education Knowledge. 2013. 4(3). P.1-20.
173. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms // FEMS Microbiology Reviews. 2013. Vol. 37(5). P. 634-663.
174. Meyer S., De Angeli A., Fernie A. R., Martinoia E. Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates // Trends in Plant Science. 2010. Vol. 15(1). P. 40-47.
175. Miller A. J., Cramer M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation // Plant and Soil. 2004. Vol. 274. P. 1-36.
176. Molisch H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Jena. 1937. 106 p.
177. Mondal M., Asaduzzaman M., Asao T. Adverse effects of allelopathy from legume crops and its possible avoidance // American Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 6. P. 804-810.
178. Monther M. T., Kamaruzaman S. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant root exudates bio-communications in the rhizosphere // African Journal of Microbiology Research. 2012. Vol. 6(46). P. 7295-7301.
179. Mortensen A., Skibsted L. H. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997. Vol. 45(8). P. 2970-2977.
180. Mosekilde E., Aracil J., Allen P. M. Instabilities and chaos in nonlinear dynamic systems // System Dynamics Review. 1988. Vol. 4(1-2). P. 14-55.
181. Motte H., Beeckman T. The evolution of root branching: increasing the level of plasticity // Journal of Experimental Botany. 2018. Vol. 70(3). P. 785-793.
182. Moubayidin L., Perilli S., Dello Ioio R., Di Mambro R., Costantino P., Sabatini S. The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase // Current Biology. 2010. Vol. 20(12). P. 1138-1143.
183. Mueller C. W., Carminati A., Kaiser C., Subke J-A. Gutjahr C. Editorial: rhizosphere functioning and structural development as complex interplay

- between plants, microorganisms and soil minerals // *Front. Environ. Sci.* 2019. Vol. 7. P. 1-3.
184. Mushtaq W., Siddiqui M. B. Allelopathy in Solanaceae plants // *Journal of Plant Protection Research*. 2018. Vol. 58(1). P. 1-7.
185. Musilova L., Ridl J., Polivkova M., Macek T., Uhlik O. Effects of secondary plant metabolites on microbial populations: Changes in community structure and metabolic activity in contaminated environments // *International journal of molecular sciences*. 2016. Vol. 17(8). P. 1-31.
186. Mustafa S., Kabir S., Shabbir U. Batool, R. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach // *Symbiosis*. 2019. Vol. 78. P. 115-123.
187. Naik P. M., Al-Khayri J. M. Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants // *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. 2016. P. 248-278.
188. Nelson E. B. The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts // *Plant and Soil*. 2017. Vol. 422(1-2). P. 7-34.
189. Nguyen C. Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls // *Sustainable Agriculture*. 2009. P. 97-123.
190. Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011. Vol. 15(2). P. 327-337.
191. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003. Vol. 67(4). P. 593-656.
192. O’Callaghan M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100(13). P. 5729-5746.
193. Oburger E., Jones D. L. Sampling root exudates – Mission impossible? // *Rhizosphere*. 2018. Vol. 6. P. 116-133.

194. Odelade K. A., Babalola O. O. Bacteria, fungi and archaea domains in rhizospheric soil and their effects in enhancing agricultural productivity // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16(20). P. 1-19.
195. Olanrewaju O. S., Ayangbenro A. S., Glick B. R., Babalola O. O. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 103. P. 1155-1166.
196. Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development // *Plant signaling & behavior*. 2009. Vol. 4(8). P. 701-712.
197. Patel S. Rye cover crop biomass, nutrient composition and crop management practices to enhance corn yield. Ames, Iowa. 2016. 79 p.
198. Peng C., Tong H., Yuan P., Sun L., Jiang L., Shi J. Aggregation, sedimentation, and dissolution of copper oxide nanoparticles: influence of low-molecular-weight organic acids from root exudates // *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9(6). P. 1-18.
199. Peng X. Allelopathic effects of water extracts of Maize leaf on three chinese herbal medicinal plants // *Not Bot Horti Agrobo*. 2019. Vol. 47(1). P. 194-200.
200. Petricka J. J., Winter C. M., Benfey P. N. Control of Arabidopsis root development // *Annual review of plant biology*. 2012. Vol. 63. P. 563-590.
201. Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress Responses // *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. Vol. 14(7). P. 14950-14973.
202. Pierret A., Maeght J. L., Clément C., Montoroi J. P., Hartmann C., Gonkhamdee S. Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research // *Annals of botany*. 2016. Vol. 118(4). P. 621-635.
203. Pii Y., Mimmo T., Tomasi N., Terzano R., Cesco S., Crecchio C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review // *Biology and Fertility of Soils*. 2015. Vol. 51(4). P. 403-415.

204. Piñeros M. A., Cançado G. M. A., Maron L. G., Lyi S. M., Menossi M., Kochian L. V. Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 - an anion-selective transporter // *The Plant Journal*. 2007. Vol. 53(2). P. 352-367.
205. Pinu F., Villas-Boas S. Extracellular microbial metabolomics: The State of the Art. // *Metabolites*. 2017. Vol. 7(3). P. 1-15.
206. Pitzschke A. Developmental peculiarities and seed-borne endophytes in Quinoa: omnipresent, robust Bacilli contribute to plant fitness // *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 1-15.
207. Podleśna A., Bojarszczuk J. Podleśny J. Effect of pre-sowing magnetic field treatment on some biochemical and physiological processes in Faba bean (*Vicia faba* L. spp. Minor) // *J. Plant Growth Regul.* 2019. Vol. 38. P. 1153-1160.
208. Portela F. C. S., Macieira B. P. B., Zanetti L. V., Gama V. N., Silva D. M., Milanez C. R. D., Cuzzuol G. R. F. How does *Cariniana estrellensis* respond to different irradiance levels? // *Journal of Forestry Research*. 2018. Vol. 30. P. 31-44.
209. Prakash D., Suri S., Upadhyay G., Singh B. N. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2007. Vol. 58(1). P. 18-28.
210. Prasad R., Bhattacharyya A., Nguyen Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives // *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 1-13.
211. Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2013. Vol. 13(1). P. 63-77.
212. Raghvendra S., Rajesh S. T., Manish K. Allelopathy: a green approach for weed management and crop production // *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 2016. Vol. 3(4). P. 43-50.
213. Raju P. World history of modern biotechnology and its applications // *Biotechnol. Ind. J.* 2016. Vol. 12(11). P. 1-8.

214. Raklami A., Bechtaoui N., Tahiri A., Anli M., Meddich A., Oufdou K. Use of Rhizobacteria and Mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 1-11.
215. Rao A. V., Balachandran B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases // *Nutritional Neuroscience*. 2002. Vol. 5(5). P. 291-309.
216. Reigosa M. J., Sánchez-Moreiras A., González L. Ecophysiological approach in allelopathy // *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999. Vol. 18(5). P. 577-608.
217. Remy E., Duque P. Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants // *Frontiers in Physiology*. 2014. Vol. 5. P. 1-10.
218. Rice E. L., Allelopathy. 2nd. Ed. New York. 1984. 422 p.
219. Rocha I. D., Ma Y., Souza-alonso P., Vosatka M., Freitas H. Oliveira R. S. Seed coating: a tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops // *Front. Plant Sci*. 2019. Vol. 10. P. 1-16.
220. Roelfsema M. R. G., Hedrich R., Geiger, D. Anion channels: master switches of stress responses // *Trends in Plant Science*. 2012. Vol. 17(4). P. 221-229.
221. Rohrbacher F., St-Arnaud, M. Root exudation: the ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation // *Agronomy*. 2016. Vol. 6(1). P. 1-27.
222. Rosier A., Medeiros F. H. V., Bais H. P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions // *Plant and Soil*. 2018. Vol. 428. P. 35-55.
223. Ruan X., Pan C. D., Liu R., Li Z. H., Li S. L., Jiang D. A., Zhang J. C., Wang G., Zhao Y. X., Wang Q. Effects of climate warming on plant autotoxicity in forest evolution: a case simulation analysis for *Picea schrenkiana* regeneration // *Ecology and evolution*. 2016. Vol. 6(16). P. 5854-5866.
224. Ruban A. V. Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis // *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 66(1). P. 7-23.

225. Ryan M. H., Graham J. H. Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops // *New Phytologist*. 2018. P. 1-16.
226. Ryser P. The mysterious root length // *Plant and Soil*. 2006. Vol. 286(1-2). P. 1-6.
227. Saha D., Marble S. C., Pearson B. J. Allelopathic effects of common landscape and nursery mulch materials on weed control // *Front Plant Sci*. 2018. Vol. 9. P. 1-8.
228. Saier M. H. A Functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. Vol. 64(2). P. 354-411.
229. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In: *molecular cloning a laboratory manual*, 2nd edition. New York. 1989. 170 p.
230. Santelia D. Root flavonoids: their transport and role in intra- and extracellular signaling. Zurich. 2006. 264 p.
231. Santos A., Chaves-Silva S., Yang L., Maia L., Chalfun-Júnior A., Sinharoy S., Zhao J., Benedito V. A. Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato // *BMC plant biology*. 2017. Vol. 17(1). P. 1-13.
232. Santos S. A., Vilela C., Freire C. S., Neto C. P., Silvestre A. J. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood // *J. Chromatogr*. 2013. Vol. 938. P. 65-74.
233. Schillaci M., Gupta S., Walker R., Roessner U. The role of plant growth-promoting bacteria in the growth of cereals under abiotic stresses // *Root Biology - Growth, Physiology, and Functions*. 2019. P. 1-21.
234. Segal E., Kushnir T., Muallem Y., Shani U. Water uptake and hydraulics of the root hair rhizosphere // *Vadose Zone Journal*. 2008. Vol. 7(3). P. 1027-1034.
235. Segami S., Tomoyama T., Sakamoto S., Gunji S., Fukuda M., Kinoshita S., Mitsuda N., Ferjani A., Maeshima M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and cytosolic soluble pyrophosphatases cooperatively regulate pyrophosphate levels in *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell*. 2018. Vol. 30(5). P. 1040-1061.

236. Shaik S. P., Thomas P. In vitro activation of seed-transmitted cultivation-recalcitrant endophytic bacteria in tomato and host<sup>-</sup> endophyte mutualism // *Microorganisms*. 2019. Vol. 7(5). P. 1-23.
237. Sharma T., Dreyer I., Kochian L., Piñeros M. A. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1-12.
238. Shi S., Richardson A. E., O'Callaghan M., DeAngelis K. M., Jones E. E., Stewart A., Condon L. M. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities // *FEMS Microbiology Ecology*. 2011. Vol. 77(3). P. 600-610.
239. Shipunov A. *Introduction to Botany*. Indonesia. 2020. 192 p.
240. Shiraishi S., Watanabe I., Kuno K., Fujii Y. Evaluation of the allelopathic activity of five Oxalidaceae cover plants and the demonstration of potent weed suppression by *Oxalis* species // *Weed Biology and Management*. 2005. Vol. 5(3). P. 128-136.
241. Shoji T. ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants // *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2014. P. 303-346.
242. Sial M. U., Zhao Z., Zhang L., Zhang Y., Mao L., Jiang H. Evaluation of insecticides induced hormesis on the demographic parameters of *Myzus persicae* and expression changes of metabolic resistance detoxification genes // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8(1). P. 1-8.
243. Sigal S. H., Rajvanshi P., Gorla G. R., Sokhi R. P., Saxena R., Gebhard D. R., Ried L. M. Gupta S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999. Vol. 276(5). P. G1260-G1272.
244. Silva G. B., Zanella C. M., Delatorre C. A., Chaves M. C., Martinelli, J. A. Federizzi L.C. Organic acid carriers in tolerance to toxic aluminum in wheat // *Ciência Rural*, Santa Maria. 2018. Vol. 48(10). P. 1-9.



245. Sitthinoi P., Lertmongkol S., Chanprasert W., Vajrodaya S. Allelopathic effects of jungle rice (*Echinochloa colona* (L.) Link) extract on seed germination and seedling growth of rice // *Agric. Nat. Resour.* 2017. Vol. 51. P. 74-78.
246. Smith S. E., Read D. J. Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants // *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd.. 2008. P. 145-163.
247. Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes // *Open Life Sciences.* 2012. Vol. 7(3). P. 373-390.
248. Souza R. de, Ambrosini A., Passaglia L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils // *Genetics and Molecular Biology.* 2015. Vol. 38(4). P. 401-419.
249. Srinivasan R., Karaoz U., Volegova M., MacKichan J., Kato-Maeda M., Miller S., Nadarajan R., Brodie E. L., Lynch S. V. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens // *Plos one.* 2015. Vol. 10(2). P. 1-22.
250. Stamp, N. "Out of the quagmire of plant defense hypotheses" // *The Quarterly Review of Biology.* 2003. Vol. 78(1). P. 23-55.
251. Steinauer K., Chatzinotas A., Eisenhauer N. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? // *Ecology and Evolution.* 2016. Vol. 6(20). P. 7387-7396.
252. Swamy M. K., Akhtar M. S., Sinniah U. R. Root exudates and their molecular interactions with Rhizospheric microbes // *Plant, Soil and Microbes.* 2016. P. 59-77.
253. Tang F. R., Loke W. K. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability // *International Journal of Radiation Biology.* 2014. Vol. 91(1). P. 13-27.

254. Tesio F., Ferrero A. Allelopathy, a chance for sustainable weed management // International Journal of Sustainable Development & World Ecology. 2010. Vol. 17(5). P. 377-389.
255. Thirumurugan D., Cholarajan A., Raja S. S., Vijayakumar R. An introductory chapter: secondary metabolites // Secondary Metabolites - Sources and Applications. 2018. P. 1-20
256. Torres N. Antolín M. C., Goicoechea N. Arbuscular Mycorrhizal symbiosis as a promising resource for improving berry quality in grapevines under changing environments // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1-18.
257. Vaiserman A. M. Radiation hormesis: historical perspective and implications for low-dose cancer risk assessment // Dose-Response. 2010. Vol. 8. P. 172-191.
258. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007. Vol. 39(1). P. 44-84.
259. Van der Heijden M. G., Schlaeppi K. Root surface as a frontier for plant microbiome research // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. Vol. 112, N 8. P. 2299–2300.
260. Verbon E. H., Liberman L. M. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development // Trends in plant science. 2016. Vol. 21(3). P. 218-229.
261. Vergara C., Araujo K. E. C., Souza S. R. de, Schultz N., Jaggin Júnior O. J., Sperandio M. V. L., Zilli J. É. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi // Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2018. Vol. 54. P. 1-24.
262. Vieira S., Sikorski J., Dietz S., Herz K., Schrumpf M., Bruehlheide H., Scheel D., Friedrich M. W., Overmann J. Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands. The ISME Journal. 2019. Vol. 14. P. 463-475.

263. Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S., Raso J. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71(9). P. 5022-5028.
264. Vives-Peris V., de Ollas C., Gómez-Cadenas A., Pérez-Clemente R. M. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond // *Plant Cell Reports*. 2019. Vol. 39. P. 3-17.
265. Vranova V., Rejsek K., Skene K. R., Janous D., Formanek P. Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: A review // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2013. Vol. 176(2). P. 175-199.
266. Walker T. S., Bais H. P., Grotewold E., Vivanco J. M. Root exudation and rhizosphere Biology // *Plant physiology*. 2003. Vol. 132(1). P. 44-51.
267. Watson H. Biological membranes // *Essays in biochemistry*. 2015. Vol. 59. P. 43-69.
268. Watt M. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface. 2nd ed. // *Annals of Botany*. 2009. Vol. 104(4). P. 9-10.
269. Weston L. A., Ryan P. R., Watt M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere // *Journal of Experimental Botany*. 2012. Vol. 63(9). P. 3445-3454.
270. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia. 2006. 1736 p.
271. Yulianto R., Xuan T. D. "Antioxidant and allelopathic activities of rice (*Oryza sativa* L.) Bran" // *Journal of Horticulture and Plant Research*. 2018. Vol. 1. P. 26-34.
272. Zelazny E., Vert G. Plant nutrition: root transporters on the move // *Plant physiology*. 2014. Vol. 166(2). P. 500-508.
273. Zhang J. Functional and structural characterization of the vacuolar anion channels AtALMT9 and AtALMT4 in *Arabidopsis thaliana*. Zurich. 2013. 135 p.

274. Zhang Y., Xu J., Riera N., Jin T., Li J., Wang N. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome // *Microbiome*. 2017. Vol. 5(1). P. 1-17.
275. Zhou G., Delhaize E., Zhou M., Ryan P. R. The barley MATE gene, HvAACT1, increases citrate efflux and Al<sup>3+</sup> tolerance when expressed in wheat and barley // *Annals of Botany*. 2013. Vol. 112(3). P. 603-612.
276. Zimmermann A., Bauer M. A., Kroemer G., Madeo F., Carmona-Gutierrez D. When less is more: hormesis against stress and disease // *Microbial cell* (Graz, Austria). 2014. Vol. 1(5). P. 150-153.
277. Zwetsloot M. J., Kessler A., Bauerle T. L. Phenolic root exudate and tissue compounds vary widely among temperate forest tree species and have contrasting effects on soil microbial respiration // *New Phytologist*. 2018. Vol. 218(2). P. 530-541.

## ДОДАТОК 1

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Публікація в науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази Web of Science:*

1. Bozhkov A. I., Kovalova M. K., **Azeez Z. A.**, Goltvjansky A. V. The effect of pre-sowing seed treatment on seedlings growth rate and their excretory activity // Regulatory mechanism in biosystem. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 60 – 66. (Web of Science). *(Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання кореневих екзометаболітів, участь у написання статті).*

*Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS:*

2. Kuznetsova Yu. A., Bozhkov A. I., Menzyanova N. G., Goltvyansky A. V., **Azeez Zaid Ali** Root exudates of wheat seedlings express antibacterial and antioxidant activity and stimulate proliferation of liver cells // Indian Journal of Natural Products and Resources. 2018. Vol. 9(4). P. 303 – 310. (SCOPUS). *(Особистий внесок здобувача: отримання кореневих екзометаболітів проростків пшениці, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову).*

3. Kovalova Marina Konstantinovna, **Azeez Zaid Ali**, Bozhkov Anatoliy Ivanovich and Kuznetsova Yuliya Aleksandrovna Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // Plant Archives. 2020. Vol. 20, Supplement 1. P. 3041 – 3049. (Konstantinovna K. M., Ali A. Z., Ivanovich B. A., Aleksandrovna K. Y. Wheat and pea seedlings as producers of biologically active compounds // 2020. Vol. 20. P. 3041-3049. (SCOPUS). *(Особистий внесок*

здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, отримання кореневих екзометаболітів, участь у написання статті).

*Публікації в зарубіжних спеціалізованих виданнях:*

4. **Azeez Zaid**, Kovalova M., Bozhkov A. Effects of pre-sowing seed treatment on the growth rate of seedlings and the activity of the excretory system of the wheat root in aquatic culture // International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology. 2018. Vol. 11(3). P. 589 – 599. (*Особистий внесок здобувача: обробка насіння гороху різними способами, культивування проростків гороху у проточному режимі, збір кореневих екзометаболітів, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, участь у написанні статті та переклад тексту на англійську мову*).

5. **Azeez Z. A.**, Bozhkov A. I., Mahmood M. T., Kovalova M. K. The species composition of epiphytic microorganisms and their influence on roots excretory activity of wheat and pea seedlings // Biochem. Cell. Arch. 2019. Vol. 19, No. 2. P. 3809 – 3818. (*Особистий внесок здобувача: проведення передпосівної обробки зерен пшениці та гороху, визначення мікроорганізмів, які знаходилися на поверхні зерен, проведення мікроскопічних, біохімічних тестів, участь у написання статті*).

*Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:*

6. **Azeez Z. A.**, Chumbash K. V. The influence of different methods of pre-sowing seeds process on root growth and on the microbes's composition of wheat seedling // Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances : XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених, 18 – 21 квітня 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 8. (*Особистий внесок здобувача: визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір*

*2-добових кореневих екзометаболітів проростків пшениці, культивування їх на МПА, написання тез).*

7. **Azeez Z. A.** Multiple diagnosis of bacteria that live on the surface of wheat seeds // Біотехнологія: Звершення та Надії : VI науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 120-річниці НУБіП України, 14 – 16 листопада 2017 р.: тези доп. Київ, 2017. С. 270.

8. **Azeez Z., Kovalova M.** The characteristics of the excretory system of wheat roots in the early stages of growth (1 st – 3 rd day) // Молодь і поступ біології : XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського, 10 – 12 квітня 2018 р.: тези доп. Львів, 2018. С. 127 – 128. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен пшениці та гороху різними способами, культивування проростків пшениці та гороху у проточному режимі, визначення довжини кореня та кількості непророслих зерен, збір кореневих екзометаболітів, участь у написанні тез).*

9. Ковальова М. К., **Азіз З. А.** Вплив передпосівної обробки насіння гороху на склад водних кореневих екзометаболітів // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві : матеріали XIII наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України, 24 – 25 жовтня 2018 р. Чернігів, 2018. С. 160 – 162. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, збір кореневих екзометаболітів проростків гороху з 1 по 3 добу росту, участь у написанні тез).*

10. **Azeez Z. A., Kovalova M. K., JEBUR A. M.** The removal of pathogenic microorganisms from the surface of pea grain depends on the method of treating seeds // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7 – 8 листопада 2018 р. Вінниця, 2018. С. 133 – 134. *(Особистий внесок здобувача: обробка зерен гороху різними способами, проведення мікроскопічних тестів, культивування мікроорганізмів на різному*

*середовищі, проведення тесту API, участь у проведенні молекулярних тестів, участь у написанні тез).*

11. **Azeez Z. A.**, Kovalova M. K., Mahmood M. T. The use of root exudates as a nutrient medium for some types of bacteria // Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського: матеріали науково-практичної конференції, 12 лютого 2020 р. Харків, 2020. С. 59 – 60. *(Особистий внесок здобувача: отримання корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, культивування мікроорганізмів на твердому середовищі, яке виготовлено на основі корневих екзометаболітів проростків пшениці та гороху, участь у написанні тез).*



